

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Biológica Celular



MATRIZ EXTRACELULAR EN EL HIPOTÁLAMO

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José Clement Serrano

Bajo la dirección de los doctores

Benjamín Fernández Ruiz

María Teresa Solas Alados

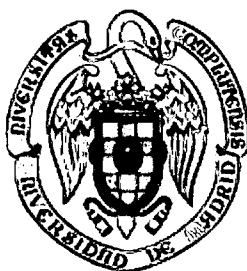
Madrid, 2002

ISBN: 84-669-1684-9

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5317338699

MATRIZ EXTRACELULAR EN EL HIPOTÁLAMO

D. JOSÉ CLEMENT SERRANO

Madrid, 2002

26226

i28445338

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

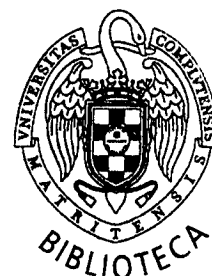
MATRIZ EXTRACELULAR EN EL HIPOTÁLAMO

Memoria presentada por:

D. José Clement Serrano

Para optar al grado de Doctor

Madrid, 2002



VºBº LOS DIRECTORES

Prof. Dr. Benjamín Fernández Ruíz

Prof. Dr. María Teresa Solas Alados

EL INTERESADO

D. José Clement Serrano

**A mis padres, José y Pilar,
y a mis hermanas Soraya y Pilar,
con todo mi cariño.**

**“Todo hombre, si lo desea, puede ser escultor de su propio cerebro”
(D. Santiago Ramón y Cajal)**

**“Querer, es poder”
(Refranero Español)**

**“La naturaleza es grande en las cosas grandes, pero es mayor en las pequeñas”
(Jacques-Henri Bernardin)**

Agradecimientos

Sería imposible en la práctica poder agradecer detalladamente a todas las personas que me han ayudado a la finalización de esta Tesis, bien directa o indirectamente por su gran número. Necesitaría un largo capítulo de este volumen. Debido a todas estas personas mi interés por las ciencias de la vida, la investigación y la docencia, va mucho más allá de una dedicación profesional, representa mi principal afición y dedicación.

Esta Tesis ha tenido muchos sobresaltos y dificultades, probablemente como ha sucedido en otras. Dificultades que básicamente se podrían resumir en la carencia de financiación, que ha sido el origen de todas las demás. Sin embargo, el bache ha sido superado, y este trabajo ha podido salir adelante gracias a las personas que me han rodeado y al tesón que me han inculcado, como necesario ante un proyecto investigador.

En primer lugar, no por ser costumbre, sino por que se lo merecen, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a los Doctores Benjamín Fernández Ruíz y María Teresa Solas Alados. No sólo por ser los directores de la Tesis, más bien porque más que ser mis jefes directos, han sido siempre un punto de apoyo y estímulo constante desde que me incorporé a su grupo allá por el año 1.993. Ellos me han sabido hacer ver el sentido práctico y teórico de la investigación. Por la paciencia que han tenido al explicarme los fallos cometidos en la consecución de este trabajo. Por haberme considerado digno de su amistad y confianza, y por su apoyo en los malos y buenos momentos.

Un papel fundamental en la consecución de la Tesis lo protagoniza el Doctor Marcelino Bañuelos Calvo. Con su metodología estricta, eficacia y clara visión de todas las triquiñuelas del laboratorio que me ha enseñado. Por su ayuda en las inmunodetecciones a microscopía óptica y en los protocolos de manejo de proteínas y anticuerpos. Todo ello provocó que se pudiera poner a punto todos los difíciles protocolos de inmunodetección de los marcajes de matriz extracelular. Y por su apoyo constante y por su amistad. Muchas gracias.

Tengo que destacar el importantísimo papel desempeñado en los estudios de microscopía electrónica de esta Tesis, por la Dra. María Luisa García. Gracias a sus enseñanzas de las técnicas de microscopía electrónica, por ser tan eficaz, estricta en los métodos y tan clara en los consejos. Gracias por toda la gran ayuda prestada en las inmunodetecciones de microscopía electrónica. Con su ayuda se pudieron poner a punto los protocolos de inmunodetección con oro coloidal de los componentes de matriz extracelular. Y sobre todo gracias por estar ahí cuando se necesitaba el consejo de una amiga.

También tengo que dar mi agradecimiento a José Ángel y a Rocío, compañeros del laboratorio. A José Ángel por su ayuda en el laboratorio y con el manejo de los animales de investigación y por ello tengo que darle ánimos para que todo lo que emprenda, le salga bien. A Rocío que se anime con el laboratorio y que aprenda todo lo que pueda aprovechando la oportunidad de aprender.

Mi más sincero agradecimiento a Luis y Cata, compañeros del Departamento de Biología Celular, por los agradables momentos pasados juntos, las risas y consejos ante las numerosas desesperanzas con los abatares de la tesis. Y también por su ayuda técnica cuando la he necesitado.

Dar las gracias también a los sucesivos directores del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense por permitirme hacer la tesis en su departamento, y utilizar por mí las instalaciones del mismo.

Tengo que dar las gracias a Alfonso Cortés, técnico de laboratorio del Departamento de Biología Celular. Por la ayuda prestada enseñándome técnicas de laboratorio y fotográficas que me han sido de gran utilidad en la consecución de la Tesis.

Agradecimiento a Carmen Rúa por enseñarme como profesora los tortuosos caminos del sistema nervioso en los animales, por resolver la gran cantidad de preguntas sobre el mismo que le he hecho que se referían a mi Tesis y otras que no lo hacían. Así como agradecer la ayuda técnica y teórica en el laboratorio, y los sabios consejos que siempre me ha dado. También a Celia Machín por su ayuda técnica y los consejos en el laboratorio.

No puede olvidar el apoyo que siempre he tenido del grupo de Rosa Mari, Mari Carmen y Mario, porque siempre han estado cuando he necesitado algo de ellos, desde consejos, hasta material de laboratorio.

Tengo que agradecer al profesor Agustín González, varias cosas. Las enseñanzas en el sistema nervioso que siempre que le he preguntado algo, ha estado dispuesto a resolverme las dudas. A su ayuda en el laboratorio de prácticas con la materia de Biología Celular. Y a sus enseñanzas técnicas del microscopio de fluorescencia y de fotografía, que me han proporcionado la suficiente habilidad como para manejar dichas técnicas en la consecución de mi Tesis.

Agradezco a Juanjo y Ana del Instituto Oftalmológico “Ramón Castroviejo” ya que siempre que se ha necesitado su ayuda, siempre estaban dispuestos a darla, con la simpatía y buen humor que les caracteriza. Tengo que destacar su gran ayuda para enseñarme las técnicas de inmunodetección a microscopía óptica en el principio de la Tesis.

Sería imperdonable olvidar la calurosa acogida y agradable estancia que tuve en la Universidad de Leipzig en Alemania por los Drs. Wolfgang Härtig y Gert Brückner. Gracias a su colaboración y estrictas enseñanzas, se han podido llevar a cabo los estudios de inmunofluorescencia y microscopía confocal que se exponen en esta Tesis.

También tengo que dar las gracias a todos los compañeros de la Asociación Española de Esclerosis Lateral Amiotrófica, Paz González, Teresa Salas, María Herranz, Jesús Jaramillo, María Jesús y María, por su apoyo constante en la última fase de la Tesis.

No podría dejar de mencionar a mis grandes amigos de la facultad que siempre me han dado ánimos continuos. Con un apoyo constante y cuando he necesitado su ayuda me la han proporcionado sin ninguna pega. Muchas gracias Mari Mar y Óscar.

Siempre hay que recordar a las personas que han apoyado cualquier cosa que he emprendido. Mis grandes amigos de toda la vida, del barrio y de mi casa. Gracias por haber estado ahí siempre que os he necesitado. Gracias Juan Picazo, Isabel Melgar, Luis Sicilia y Sonia Melgar.

Por último, y sin embargo, más importante agradezco a mis padres José Clement y María del Pilar Serrano todo el apoyo que me han prestado durante la consecución de esta Tesis. Por compartir conmigo los sinsabores y alegrías de la misma. Por aguantar mi mal genio cuando las cosas no iban bien. Por escucharme cuando los necesitaba. Por su ayuda económica. Por estas y otras muchas más os estoy eternamente agradecido.

Y por supuesto agradezco a mis hermanas Soraya y Pili, por su siempre incondicional apoyo, por sus ánimos, y por todo lo que me han ayudado y aguantado a lo largo de estos años de Tesis. También agradezco a mi abuela Adoración Asensio, quien ha estado siempre dándome ánimos y por su apoyo económico al final de la Tesis. Finalmente agradezco a mi abuela Apolonia Pérez todo lo que me ha enseñado, que no la olvido.

ÍNDICE

	Páginas
<u>Introducción</u>	1
1.- Matriz extracelular en el encéfalo	1
1.a.- Existencia demostrada de la matriz extracelular en el encéfalo y volumen que ocupa	1
1.b.- Componentes mayoritarios de la matriz extracelular en encéfalo: hialuronato, proteoglucanos y glucoproteínas	2
1.c.- Proteoglucanos condroitín sulfato	4
1.c.1.- Lecticanos	5
1.c.2.- Otros proteoglucanos no lecticanos	9
1.c.3.- Función de los lecticanos como estructuradores de la matriz extracelular junto con ácido hialurónico y tenascinas	9
1.d.- Tenascinas	13
1.e.- Proteoglucano queratán sulfato en la matriz extracelular	14
1.f.- Matriz extracelular en el hipotálamo	14
2.- Matriz extracelular y redes perineuronales	18
2.a.- Las redes perineuronales: Estudio y función	20
2.b.- Síntesis de las redes perineuronales	43
2.c.- Patrón de aparición de las redes perineuronales en el desarrollo	45
2.d.- Correlación: Redes perineuronales y función neuronal	47
2.e.- Redes perineuronales y patologías	55
3.- Matriz extracelular y redes perineuronales en el hipotálamo	63
<u>Objetivos</u>	67
<u>Material</u>	69

<u>Métodos</u>	70
1.- Diseño experimental	70
1.a.- Estudio en el desarrollo, adultos y vejez	70
1.b.- Estudio de funcionalidad	72
1.c.- Estudio de lactancia	73
2.- Microscopía óptica	74
2.a.- Anestesia	74
2.b.- Perfusión	74
2.c.- Extracción del encéfalo	74
2.d.- Procesado del encéfalo	75
2.e.- Microtomía	76
2.f.- Tinciones	77
3.- Microscopía electrónica	81
3.a.- Anestesia y perfusión	81
3.b.- Fijación y lavado	81
3.c.- Corte en vibratomo	82
3.d.- Deshidratación e inclusión	82
3.e.- Microtomía y observación microscópica electrónica	82
4.- Inmunodetección	83
4.a.- Anticuerpos utilizados para microscopía electrónica	8
5.- Micrografías	83
5.a.- Micrografías ópticas	83
5.b.- Micrografías electrónicas	83
6.- Protocolos	84
6.a.- Protocolos de histoquímica	84

6.a.1.- Método del hierro coloidal	84
6.a.2.- Método de la aglutinina de la <i>Wisteria floribunda</i> y de <i>Pisun sativum</i>	85
6.a.3.- Método de la NADPH diaforasa	86
6.b.- Protocolos de inmunohistoquímica	87
6.b.1.- Inmunodetección a microscopía óptica	87
6.b.2.- Inmunodetección a microscopía óptica de fluorescencia	88
6.b.3.- Inmunodetección a microscopía electrónica	90
<u>Resultados</u>	93
1.- Distribución de la tinción con la histoquímica del hierro coloidal	93
2.- Distribución de la tinción con la histoquímica de la NADPH Diaforasa	98
3.- Distribución del marcaje con la aglutinina de <i>Pisun sativum</i>	105
4.- Distribución del marcaje de la <i>Wisteria floribunda</i>	109
5.- Distribución y localización del proteoglucano condroitín 0-sulfato	115
6.- Distribución y localización del proteoglucano condroitín 4-sulfato	132
7.- Distribución y localización del proteoglucano condroitín 6-sulfato	143
8.- Distribución y localización del proteoglucano queratán sulfato	154
9.- Distribución y localización de tenascina	160
10.- Resultados del experimento de lactancia en rata	167
11.- Colocalización de matriz extracelular con distintos marcadores	167
<u>Discusión</u>	175
1.- Las redes perineuronales	175
2.- Matriz extracelular del cerebro en el desarrollo	191

<u>Conclusiones</u>	203
<u>Bibliografía</u>	205

INTRODUCCIÓN

1.- Matriz extracelular en el encéfalo

En 1.962 en un simposio sobre el sistema nervioso (según Rulka et al., 1.988, citado por Bignami et al., 1.993), los asistentes al acto salieron divididos con dos opiniones irreconciliables. Los biólogos celulares decían que la matriz extracelular, como existe en otros sistemas, también debía existir en el sistema nervioso central. Los morfólogos, no sólo rechazaban la existencia de la matriz extracelular en el cerebro, además se apoyaban en pruebas de microscopía electrónica del sistema nervioso central en el que estaban los elementos neuronales y gliales altamente compactados reduciendo el espacio extracelular al mínimo. Argumentaban que el fluido intracelular de las células gliales que rodearía a las neuronas representa el espacio extracelular que existe, por ejemplo en tejido conjuntivo (Nicholls, 1.989).

1.a.- Existencia demostrada de la matriz extracelular en el cerebro y volumen que ocupa.

En pruebas de microscopía electrónica aparecía espacio intercelular vacío, que se explicaba porque durante el procesado de tejidos se podría extraer su contenido. Pero actualmente está aceptado que el pequeño espacio extracelular cerebral es un artefacto. Clorhidrato de cetil-pirimidina o ácido tánico es el complemento para fijación mejor utilizado para perfundir a la rata y conservar los componentes de la matriz extracelular. Ambos componentes previenen la solubilización del ácido hialurónico durante el procesado o marcaje. Se acepta que el espacio extracelular se encuentra alrededor del 17 al 20 % del

volumen total del cerebro (Nicholson y Rice, 1.986; citados por Bignami et al., 1.993; Cervós-Navarro et al., 1.994) otros investigadores incluso asignan una cantidad mayor como el 25 % (Brückner et al., 1.996). El volumen de matriz extracelular está en relación con los cambios de actividad neuronal (Van Harreveld, 1.972; Svoboda y Syková, 1.991; Dóczi, 1.993; Lehmenkühler et al., 1.993; Syková y Chvátal, 1.993), y su nivel de plasticidad (Theodosis et al., 1.999). Investigaciones histoquímicas (Brückner et al., 1.996) indican que la matriz extracelular está acompañada por una marcada heterogeneidad química. Esta heterogeneidad puede estar provocada por la acumulación de distintos tipos de proteoglucanos de condroitín sulfato, mayor componente de la matriz extracelular. Esta heterogeneidad es máxima en las redes perineuronales en sustancia gris, algo que también ocurre en la sustancia blanca, en los nodos de Ranvier.

1.b.- Componentes mayoritarios de la matriz extracelular en cerebro: hialuronato, proteoglucanos y glucoproteínas.

Las principales macromoléculas que podemos encontrar en la matriz extracelular del sistema nervioso son glucosaminoglucanos como el hialuronato, proteoglucanos y glucoproteínas.

La estructura del ácido hialurónico se encuentra muy conservada en la evolución desde bacterias a mamíferos (Bignami et al., 1.993). Es un polisacárido compuesto por cantidades iguales de ácido D-glucurónico y de 2-acetamido-2-desoxiglucosa, agrupados de dos en dos, repetidos muchas veces. El hialuronato no posee proteína central, no formando estructura de proteoglucano, pero forma agregados con proteoglucano condroitín sulfato. Se localiza extracelularmente en el sistema nervioso postnatal y adulto. Se sintetiza en la cara externa de

la membrana plasmática como un polímero lineal libre por la ácido hialurónico sintetasa, en contraste con otros glucosaminoglucanos que se sintetizan en el aparato de Golgi y son unidos a proteínas. En los lugares de síntesis puede provocar cambios en el volumen de tejidos y la creación de espacios libres de células. La estabilidad de estos espacios libres dependerán de las interacciones con las proteínas hialuronectinas. (Lee y Spicer, 2.000)

Este compuesto es característico del tejido conjuntivo, cordón umbilical, líquido sinovial y paredes vasculares. En el cerebro, las neuronas pueden producirlo, pues se detecta su presencia a microscopía electrónica en el citoplasma y núcleo de neuronas en cerebro maduro (Aquino et al., 1.984; Ripellino et al., 1.988, 1.989). En sustancia gris formando agregados sobre la superficie de grandes neuronas en algunos sitios, como el asta anterior de médula espinal, núcleos profundos del cerebelo o corteza cerebral entre otros. También es detectado en sustancia blanca en la superficie de las capas de membrana que envuelven los astrocitos y oligodendrocitos los axones en el sistema nervioso central y entre la superficie de las membranas de las células de Schwann en el sistema nervioso periférico (Eggli y Graber, 1.996).

Tiene una función esencial en la proliferación y migración en el desarrollo del sistema nervioso (Margolis et al., 1.975; Delpech et al., 1.989). También se asocia con la división celular al aparecer rodeando a los cromosomas. Se le relaciona con el mantenimiento de la forma celular y del núcleo, así como la matriz nuclear y la interacción con microtúbulos (Lee y Spicer, 2000).

Los proteoglucanos son moléculas de alto peso molecular que se componen de un núcleo proteico que está unido covalentemente a cadenas de polisacáridos y disacáridos complejos. A

estos hidratos de carbono complejos se les llama glucosaminoglucanos. Tienen un núcleo proteico (proteína axial) que puede oscilar entre 250 a 650 KDa de peso molecular. Este núcleo puede unir distintos glucosaminoglucanos por un punto conocido como enlace. La unión de monómeros de proteoglucanos da como resultado agregados de alto peso molecular. Los grupos sulfatados y carboxilos de los glucosaminoglucanos les confieren una alta concentración de cargas aniónicas. Todos los glucosaminoglucanos, con la excepción del ácido hialurónico, libre en la matriz extracelular, están ligados covalentemente a una proteína formando los distintos tipos de proteoglucanos.

Los glucosaminoglucanos se unen a la proteína por secuencias de glucuronil-galactosil xilosil-serina-Proteína. Los proteoglucanos se clasifican dependiendo del glucosaminoglucano que tengan unido, no por el tipo de proteína que sea el núcleo. Esta clasificación se justifica porque aún no se conocen la mayoría de las proteínas que forman los proteoglucanos pero sí son conocidos los glucosaminoglucanos unidos a ellas.

1.c.- Proteoglucanos condroitín sulfato.

El proteoglucano condroitín sulfato es el más abundante, junto con el proteoglucano heparán sulfato en el cerebro. De los tres distintos proteoglucanos condroitín sulfato (4 sulfato, 6 sulfato y 0 sulfato), el isómero más abundante es el 4 sulfato (Hascalland y Kimura, 1.982, citado por Bertolotto et al., 1.990). Debido al gran número de proteoglucanos distintos y sus bajas concentraciones en el sistema nervioso, problemas de fijación, tinción, aislamiento y purificación, ha sido difícil caracterizarlos hasta hace poco. Con anticuerpos monoclonales y técnicas de biología molecular han abierto nuevos caminos para el estudio de los proteoglucanos. Todavía la literatura actual en la que se refieren a localización, interacciones,

y funciones de los proteoglucanos en el sistema nervioso, es frecuentemente confusa y contradictoria, sobre todo con los condroitín sulfato proteoglucanos.

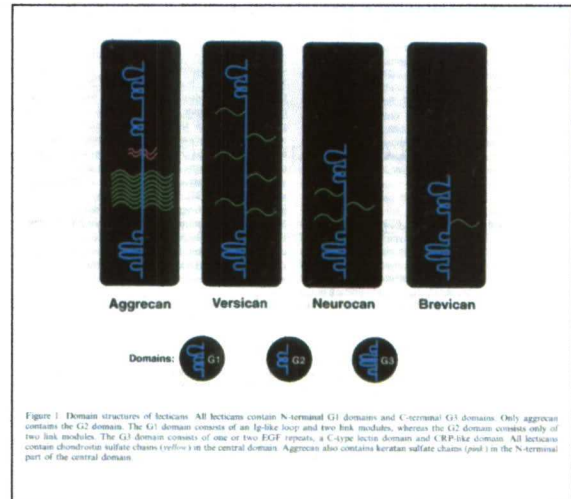
Los condroitín 4-sulfato y 6-sulfato eran denominados antiguamente condroitines A y C respectivamente. Es un hidrato de carbono en el que se repite el disacárido 0-beta-D-ácido-glucopiranosilurónico-2-acetamido-2-desoxi-0-sulfo-beta-D-galactopiranososa, con uniones (1→4) y (1→3). La diferencia entre los dos tipos es la posición del grupo sulfatado. Se encuentran el condroitín sulfato de manera característica en el cartílago, córnea, pared de vasos y en ciertos tumores (condrosarcomas, cordomas, etc.). Tienen un importante papel en el desarrollo del sistema nervioso, en altas concentraciones inhibe el crecimiento de neuritas y en bajas concentraciones promueve su crecimiento (Oohira et al., 2.000).

1.c.1.- Lecticanos

· Características estructurales

Los lecticanos son una familia de proteoglucanos condroitín sulfato, como por ejemplo agrecán, versicán, neurocán y brevicán. Se caracterizan al poseer dominios de unión a ácido hialurónico y un dominio lectina tipo-C en su núcleo proteico. A través de estos dominios el lecticán interacciona con hidratos de carbono y proteínas ligando en matriz extracelular y actuando como.

En el cerebro adulto, los lecticanos están interactuando con ácido hialurónico y tenascinas formando un complejo ternario. Por ello, se ha propuesto que el ácido hialurónico, lecticanos y tenascina constituyan el núcleo donde se reúnen los componentes de la matriz extracelular en el cerebro adulto, el cual es encontrado principalmente en los espacios pericelulares de neuronas con redes perineuronales (Yamaguchi, 2.000).



• **Agrecán, versicán, brevicán y neurocán. Características y patrones de expresión en el sistema nervioso central.**

Al agrecán se le detectó primeramente en tejido cartilaginoso. En el sistema nervioso el agrecán fue identificado como el antiguo marcador Cat-301 (McKay y Hockfield, 1982), como un proteoglucano que une ácido hialurónico (Fryer et al., 1.992; Margolis et al., 1.996). Está sintetizado por astrocitos y se le ha detectado como componente estructural de las redes perineuronales (Bignami et al., 1.993). Su expresión se incrementa desde el día embrionario 14 hasta el día 15 postnatal, después aparece de forma constante en la vida de la rata (Oohira et al., 2.000; Yamaguchi, 2.000).

El versicán fue identificado por primera vez en fibroblastos de tejido conjuntivo. Aparece en el tejido periférico con menos cantidad del glucosaminoglucano condroitín sulfato que en tejido no nervioso. Es sintetizado por oligodendrocitos y células de Schwann (Le Baron, 1.996; Courel et al., 1.998; Yamaguchi, 2.000). Es conocido que la variación en el

número y longitud de los glucosaminoglucanos da variabilidad entre proteoglucanos con el mismo núcleo proteico (Bignami et al., 1.993; Hardingham y Fosang, 1.992). Se ha detectado como componente estructural de las redes perineuronales (Bignami et al., 1.993). Tiene varios patrones de expresión según las diferentes isoformas, la isoforma CS α se incrementa desde el día 10 al 100 postnatal, y la isoforma CS β de manera similar al neurocán desde el día postnatal 2 al 6 para después volver a niveles más bajos, parecidos a los iniciales (Yamaguchi et al., 2.000; Oohira et al., 2.000). El neurocán no es de crucial importancia para el sistema nervioso central a la hora del desarrollo cerebral y mantenimiento en general, pues ratones con el gen para codificar neurocán defectuoso eran viables, fértiles y no se apreciaba ningún defecto anatómico, morfológico y ultraestructural. Sólo tenían ligero retardo en la plasticidad por potenciación a largo plazo, por pequeños defectos en la sinapsis. Puede existir redundancias entre otras lectinas o fosfacán, que pueden ser estudiadas en el futuro por dobles *knockouts*. (Zhou et al., 2.002). Sin embargo experimentos para dobles *knockouts* para agrecán y versicán son letales en estadios tempranos de la vida.

Una variante del versicán es el GHAP que aparece en nodos de Ranvier en sistema nervioso central y periférico (Delpech et al., 1.982), y en oligodendrocitos *in vitro* (Asou et al., 1.983). Aparece en sustancia blanca con excepción de la capa granular del cerebelo. El receptor del GHAP en astrocitos es el CD44 (Bignami et al., 1.993). Este proteoglucano además de unirse a hialuronato se colocaliza con tenascina (Perides et al., 1.993)

El brevicán es uno de los proteoglucanos condroitín sulfato más abundantes del sistema nervioso adulto. Se sintetiza por astrocitos (Yamada et al., 1.994) y por oligodendrocitos (Seidenbecher et al., 1.998). Se expresa únicamente en sistema nervioso (Yamaguchi et al., 1.996). Interacciona con el ácido hialurónico y también con tenascina-R

(Hagihara et al., 1.999; Angelov et al., 1.998; Wintergerst et al., 1.996). Se expresa escasamente en el periodo embrionario, incrementándose varias semanas después del nacimiento (Yamada et al., 1.997; Milev et al., 1.998) y más concretamente su expresión aumenta desde el día embrionario 14 hasta el día 15 postnatal, después aparece constante (Yamaguchi, 2.000; Oohira et al., 2.000). Actúa como inhibidor del crecimiento de neuritas estabilizando las sinapsis existentes (Friedlander et al., 1.994).

El neurocán fue identificado por clonación de su gen al relacionarse estructuralmente con agrecán y versicán (Rauch et al., 1.991). Este proteoglucano condroitín sulfato sólo es expresado en sistema nervioso. Es sintetizado por neuronas (Engel et al., 1.996) y por astrocitos (Oohira et al., 1.994). Interacciona con tenascina-C y R (Milev et al., 1.997, 1.998), así como con ácido hialurónico (Margolis et al., 1.996). La expresión de neurocán es muy acentuada desde el día 2 al 6 postnatal y después declina rápidamente a niveles iniciales (Yamaguchi, 2.000; Oohira et al., 2.000). Como molécula completa es difícil encontrarlo en el sistema nervioso adulto, pero se pueden encontrar fragmentos derivados de su proteolisis (Matsui et al., 1.998). El fragmento N-terminal tiene 130 kDa y se le denomina neurocán-130. Y el fragmento C-terminal de 150 kDa es llamado neurocán-C. El grupo de Matsui et al. (1.998), describen el neurocán 130, pero no el neurocán-C como componente de las redes perineuronales. El neurocán 130 fue detectado predominantemente en el citoplasma de prolongaciones de astrocitos que envolvían somas neuronales. Generalmente los proteoglucanos están localizados en la matriz extracelular, sin embargo, en este caso fueron localizados en el citoplasma astrocitario.

1.c.2.- Otros proteoglucanos no lecticanos.

El fosfacán es el más grande proteoglucano condroitín sulfato no lecticano y se suele colocalizar con neurocán (Milev et al., 1.998). Es sintetizado por los astrocitos (Engel et al., 1.996). Interacciona uniéndose a varios componentes de la matriz extracelular. Se une a ácido hialurónico (Margolis et al., 1.996), con las dos tenascinas, tenascina-C (Grumet et al., 1.994; Milev et al., 1.997) y tenascina-R (Milev et al., 1.998). El fosfacán también interacciona con la molécula HB-GAM (unión de heparina – crecimiento asociado a molécula) que activa el crecimiento de neuritas.

1.c.3.- Función de los lecticanos como estructuradores de la MEC junto con ácido hialurónico y tenascinas.

Los proteoglucanos se encuentran presentes como componentes de la matriz extracelular, superficie celular y como proteínas transmembrana en neuronas y glía. Los proteoglucanos condroitín sulfato se encuentran preferentemente como componentes de la matriz extracelular o en la superficie celular en el cerebro maduro. Se dividen en tres grupos según la sulfatación de la unidad disacárida de los glucosaminoglucanos. Los proteoglucanos heparán sulfato tienen gran variabilidad, la mayoría de ellos como componentes de las membranas plasmáticas.

Análisis bioquímicos han demostrado la presencia de condroitín sulfato y heparán sulfato en neuronas y astrocitos aislados, pero no en oligodendrocitos (Margolis y Margolis, 1.974), y la biosíntesis de condroitín sulfato proteoglicanos ha sido descrita tanto para neuronas

(Hoffman y Edelman, 1.987; Murillo-López et al., 1.991) como para astrocitos (Norling et al., 1.984; Gallo et al., 1.987; Gallo y Bertolotto, 1.990; Jonhson-Green et al., 1.991).

El hialuronato es un componente ubicuo en la sustancia gris con tres excepciones: la sustancia gelatinosa de la médula espinal, capa molecular del cerebro, retina y segmento proximal del nervio óptico en el canal escleral (Bignami et al., 1.993). El hialuronato forma en la sustancia gris unos agregados pericelulares que rodean grandes neuronas en distintas localizaciones, idénticos a la imagen de las redes perineuronales (Blümcke et al., 1.995)

Gracias a la gran variedad de anticuerpos contra moléculas de la matriz extracelular, muchos investigadores han descrito una localización perineuronal del condroitín sulfato proteoglucano (previa digestión con condroitinasa). El ácido hialurónico se colocaliza con proteoglucano condroitín sulfato, dando como resultado igual distribución en la matriz extracelular. Estudios recientes indican que el versicán es el condroitín sulfato que se colocaliza con el hialuronato en la sustancia gris y el GHAP ("glial hyaluronic acid-binding protein"), y hialuronato en la sustancia blanca (Bignami et al., 1.993).

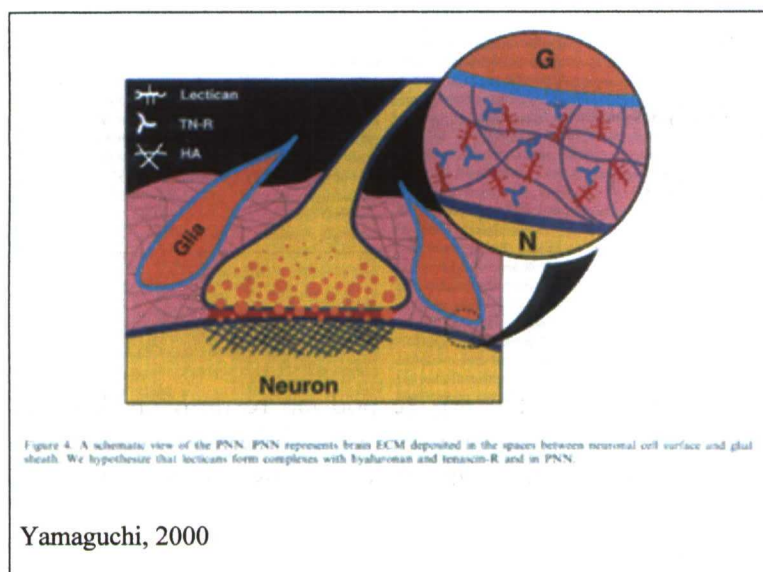
Una molécula "puente" entre los proteoglucanos de matriz extracelular por medio de la membrana citoplásmica y el citoesqueleto de la neurona son las integrinas (Jones, 1.996). Estas moléculas sirven de anclaje así como de receptores de señales extracelulares que su activación puede desencadenar la actuación de segundos mensajeros.

Yamaguchi (2.000) hipotetiza sobre la estructura de la matriz extracelular. Propone un complejo ternario como base de su construcción que podría tener su expresión máxima en las redes perineuronales. Este complejo estaría compuesto por ácido hialurónico-lecticán-

tenascina. Considerando la naturaleza de varios sitios de unión de la tenascina se propone que gracias a la asociación de estas moléculas resulta en la formación de una organizada red de ácido hialurónico en los espacios intercelulares.

El lecticán tiene alta afinidad por la tenascina-R, puede incrementar el nivel de enlaces cruzados en las cadenas de ácido hialurónico, *tightening of the matrix*, según Yamaguchi. Una degeneración del lecticán puede provocar una bajada en el nivel de enlaces cruzados, *loosening of the matrix*, según Yamaguchi. Esta degeneración puede tener distintas causas como proteinasas que afecten al núcleo proteico, expresión alterada de lecticanos, o lecticanos con baja afinidad por sus ligandos, también por un aumento de ácido hialurónico. Este modelo

puede actuar como barrera física para determinados materiales, formando una barrera repulsiva de crecimiento axonal y neurítico. Este es un modelo simplificado en cual deberían añadirse otras moléculas. (Yamaguchi, 2.000)

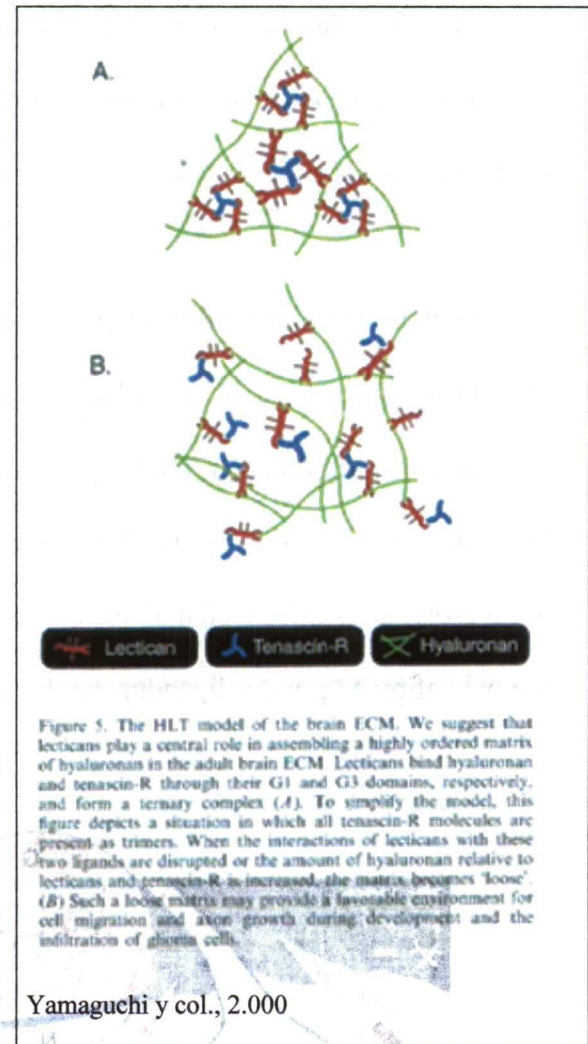


Por la complejidad y diversidad de la estructura de los proteoglicanos, sus funciones están determinadas probablemente por numerosos factores que incluyen las moléculas con que interaccionan, su expresión espacial y temporal, y si las células responden a la proteína central del proteoglicano, a los glucosaminoglicanos, o a ambos.



Los proteoglucanos están implicados en: la regulación de la morfología celular, en la adhesión celular, en la ontogenia del cerebro (proliferación, migración y diferenciación), en la presentación y unión de factores de crecimiento, en transducción de señales, y en la organización y estabilización de la sinapsis en el adulto.

Las cadenas de glucosaminoglucanos unidos a los proteoglucanos en la matriz extracelular también van a favorecer la imbibición de agua, captura de compuestos amonio cuaternario (ejemplo: acetil-colina) y captura de aminos biógenas.



Como conclusión las funciones de los proteoglucanos se podrían resumir en dos: a.- El mantenimiento de estructuras de matriz extracelular, como de contactos celulares, formación de sinapsis (plasticidad neuronal), receptores tróficos que promueven el crecimiento axonal y de neuritas. b.- Mantenimiento y desarrollo de la diversidad neuronal del sistema nervioso central de mamíferos, que depende de interacciones célula-célula y célula-sustrato entre moléculas de adhesión celular de matriz extracelular y factores neurotróficos.

1.d.- Tenascinas

Las tenascinas son glucoproteínas de matriz extracelular que se encuentran en sistema nervioso central además de otros tejidos. En total se conocen diferentes isoformas por procesamiento alternativo del ARNm (Erickson, 1.993), los tipos C, R, X, Y y W. Tiene una estructura en forma de seis brazos o hexabraquión. Sin embargo, en el sistema nervioso central aparecen dos tipos de tenascinas: La tenascina-R y la tenascina-C. Durante el desarrollo es uno de los mayores componentes de la superficie neuronal y astrocitaria (Erickson, 1.993; Crossin, 1.994; Faissner y Steindler, 1.995). Su expresión en el desarrollo del sistema nervioso central está temporalmente controlada y espacialmente restringida. Las funciones atribuidas a la tenascina son, migración neuronal (Husmann et al., 1.992), promoción o inhibición del crecimiento de neuritas e inhibición del crecimiento del cono axónico en diferentes situaciones (Faissner y Kruse, 1.990). En adultos aparece en escasa cantidad (Bartsch et al., 1.992; Zhang et al., 1.995) y en gran cantidad durante el desarrollo y en la regeneración de tejidos dañados (Laywell et al., 1.992; Becker et al., 1.995; Zhang et al., 1.995).

La tenascina-C es capaz de interactuar con distintos componentes de la matriz extracelular, como se pone de manifiesto distintos trabajos de localización de componentes en las redes perineuronales. Interacciona, por tanto, con neurocán y fosfacán (Milev et al., 1.997, 1.998), así como con ácido hialurónico. Actúa durante el desarrollo del cerebro, regeneración axonal, génesis de tumores y daño en el tejido nervioso (Weber et al., 2.002). Si se anula la expresión del gen de la tenascina C utilizando ratones *knockout* (Weber et al., 2.002), aparecen defectos en el balance de serotonina y dopamina, y a nivel ultraestructural se altera la unión neuromuscular y los nervios periféricos.

La tenascina-R es expresada por oligodendrocitos durante la mielinización en el desarrollo (Weber et al., 1.999) y en adultos (Wintergerst et al., 1.993). Se detecta ente axones amielínicos y en los nodos de Ranvier. La tenacina-R, al igual que la de tipo C, se une a diversos tipos de moléculas de la matriz extracelular. Se une a HNK-1, neurocán, versicán y fosfacán, así como a otras moléculas de tenascina-R (Milev et al., 1.997; Weber et al., 1.999) y también con ácido hialurónico. Suele inhibir el crecimiento de neuritas y promueve la diferenciación neuronal acentuando la polarización. Si se bloquea la expresión del gen de la tenascina-R estudiando en ratones *knockout*, aparecen alteraciones en la distribución en la matriz extracelular asociadas con las redes perineuronales y los nodos de Ranvier. Además también aparece un acusado decremento en la velocidad de conducción del impulso nervioso (Weber et al., 1.999).

1.e.- Proteoglucano queratán sulfato en la matriz extracelular.

Se compone de unidades de D-galactosa y N-acetil-D-glucosamina unidas por enlace beta-D-galactosídicos (1→4). El sulfato se encuentra en el carbono 6 de la glucosamina. Se encuentra especialmente en las paredes de las arterias.

1.f.- Matriz extracelular en el hipotálamo.

El hipotálamo es la parte del diencefalo vinculada con la regulación central de las funciones viscerales, autónomas, endocrinas, y la conducta afectiva. Está situado a derecha e izquierda del tercer ventrículo. La hipófisis está unida al infundíbulo, y por éste al hipotálamo que se sitúa a partir del quiasma óptico sobre la cara ventral del encéfalo. La porción más

distal del proceso infundibular es la neurohipófisis (Kahle y col., 1.992). El hipotálamo se encuentra limitado por delante por el quiasma óptico, lateralmente por las cintillas ópticas y posteriormente por los tubérculos mamilares. Su estructura se puede dividir en tres partes: preóptica, situada delante del quiasma óptico, la región del *tuber cinereum* que se continúa con el infundíbulo y la región de los cuerpos mamilares. La región preóptica se compone de neuronas parvocelulares desde la comisura anterior hasta el tercer ventrículo. Se continúa caudalmente con los dos núcleos magnocelulares, el núcleo supraóptico y paraventricular. El núcleo supraóptico se sitúa lateral al quiasma óptico y tracto óptico. El núcleo paraventricular se sitúa en la parte lateral superior de la pared del tercer ventrículo, estando separado del epéndimo sólo por una capa glial. El núcleo magnocelular preóptico se sitúa lateral al núcleo supraóptico en la parte más lateral del hipotálamo.

Las células de los núcleos supraóptico y paraventricular poseen aspecto similar. Son más grandes que las células de la sustancia gris central que la rodea y se colorean intensamente con anilinas. Los gránulos de Nissl están distribuidos en su periferia, y aparecen inclusiones de naturaleza coloidal que son consideradas sustancias neurosecretoras (cuerpos de Herring). Los dos núcleos envían fibras al lóbulo posterior de la hipófisis o neurohipófisis. Las fibras del núcleo supraóptico y paraventricular forman el haz supraóptico-hipofisario. Secretan dos hormonas pépticas llamadas oxitocina y vasopresina (ADH-hormona antidiurética). Las hormonas se forman en el cuerpo celular y se unen a una proteína transportadora llamada neurofisina. El conjugado se transporta por el axón y se libera en los vasos de la neurohipófisis. Cada tipo celular produce también una neurofisina característica. Estudios a microscopía electrónica revelan que el material neurosecretor está formado por agregados de gránulos de 50 a 200 nm. de diámetro. Las dos hormonas son producidas en los dos núcleos, pero la secreción de vasopresina es más abundante en el núcleo supraóptico y la oxitocina en el núcleo paraventricular. El núcleo supraóptico está específicamente relacionado con el mantenimiento del equilibrio hídrico del organismo. La producción de hormona vasopresina (o ADH) está relacionada con los cambios de presión osmótica de la sangre que irriga a los núcleos supraópticos. La oxitocina, producida en mayor medida por

el núcleo paraventricular, va a actuar en la contracción del músculo liso del útero en el parto y en la contracción del músculo liso que rodea los alvéolos de las glándulas mamarias.

En relación a la matriz extracelular del hipotálamo los datos son escasos. Se conocen varios núcleos o regiones en donde se han observado algunas neuronas con redes perineuronales (Seeger et al., 1.994; Bertolotto et al., 1.996). En el caso de los núcleos magnocelulares supraóptico y paraventricular no se han detectado redes perineuronales y forma parte de su matriz extracelular la tenascina-C (Theodosis et al., 1.997), tenascina asociada a desarrollo embrionario. Estos núcleos presentan plasticidad estructural en adultos en respuesta a estímulos fisiológicos como lactancia y sed prolongada (Hatton, 1.990).

La glía limitante ventral, subyacente al núcleo supraóptico, incluye una población de astrocitos que extienden sus prolongaciones hacia las zonas dendríticas y de cuerpos celulares de las neuronas magnocelulares (Salm y Hatton, 1.980; Salm et al., 1.985). Aparecen profundas remodelaciones morfológicas durante la estimulación del núcleo (parto, lactancia y deshidratación), que son: incremento en la extensión de haces dendríticos (Perlmutter et al., 1.984); formación de sinapsis adicionales (Theodosis et al., 1.981; Hatton y Tweedle, 1.982; Perlmutter et al., 1.984; Tweedle y Hatton, 1.984; Chapman et al., 1.986); formación de uniones tipo GAP (Cobbett y Hatton, 1.984); y cambios en la cantidad de recubrimiento del astrocito en el soma, dendritas o ambos en la neurona. Y siempre con la parada del estímulo, la mayor parte de estos cambios revierten (Hatton, 1.990; Theodosis y Poulain, 1.993).

Los astrocitos expresan de forma variable tenascina en el núcleo supraóptico, por ello esta glucoproteína puede tener una importante función en la plasticidad de este núcleo en adultos. Cuando se estimula con deshidratación en ratas, el marcaje de tenascina disminuye sensiblemente a partir del sexto día, revirtiendo a valores normales cuando cesa la

estimulación (Singleton y Salm, 1.996). Por lo que se sugiere que la producción de tenascina constituye una barrera de interacción célula – célula como la formación de sinapsis y uniones tipo GAP. Cuando disminuye la estimulación, hay poca tenascina que facilita la interacción entre las células.

En los núcleos supraóptico y paraventricular se detectaron tenascina-C en los somas de los astrocitos (Bonfanti et al., 1.993) y en las dendritas neuronales y sus aferencias (Armstrong et al., 1.982). Debido a la tenue reacción de la tenascina-C se suele emplear métodos especiales para poner de manifiesto esta inmunorreactividad, como por ejemplo con la técnica de la glucosa oxidasa con níquel y diaminobencidina (Theodosis et al., 1.997). A nivel ultraestructural no se detecta en el citoplasma astrocitario en estado normal, según Theodosis, porque existe un intercambio rápido de tenascina-C citoplasma-matriz extracelular (Faissner et al., 1.994). Si se suprime este intercambio rápido con colchicina el marcaje únicamente aparece en astrocito y no en neuronas. El marcaje en situación normal aparece en la superficie de astrocito, cerca de su membrana plasmática, colocalizándose en astrocitos que se marcan con la proteína gliofibrilar ácida en doble marcaje de microscopía óptica de fluorescencia. Sin embargo, no todas las prolongaciones de astrocitos presentan esta reactividad (Theodosis et al., 1.997).

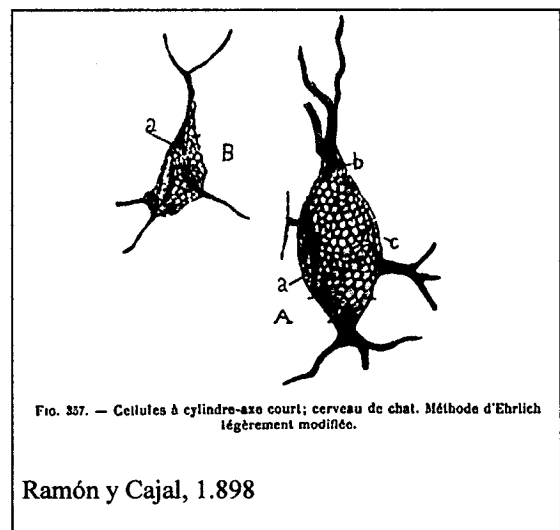
Otra sustancia que se ha estudiado en el hipotálamo es el ácido polisiálico. Aparece durante el desarrollo, después sólo permanece en zonas donde existe mucha plasticidad como en el sistema neuro-hipofisario-hipotalámico (Bonfanti et al., 1.992, 1.996). Se ha detectado un importante regulador de interacciones de superficie celular que reduce la adhesión celular, es el ácido polisiálico que se encuentra situado en el dominio extracelular del N-CAM. Cuando en el sistema hipotálamo-neurohipofisario aparecen cambios morfológicos por

estimulación fisiológica se expresa fuertemente ácido polisiálico. Por esta razón es necesaria su presencia para que se produzca plasticidad ante un estímulo. (Theodosios et al., 1.999)

2.- Matriz extracelular y redes perineuronales

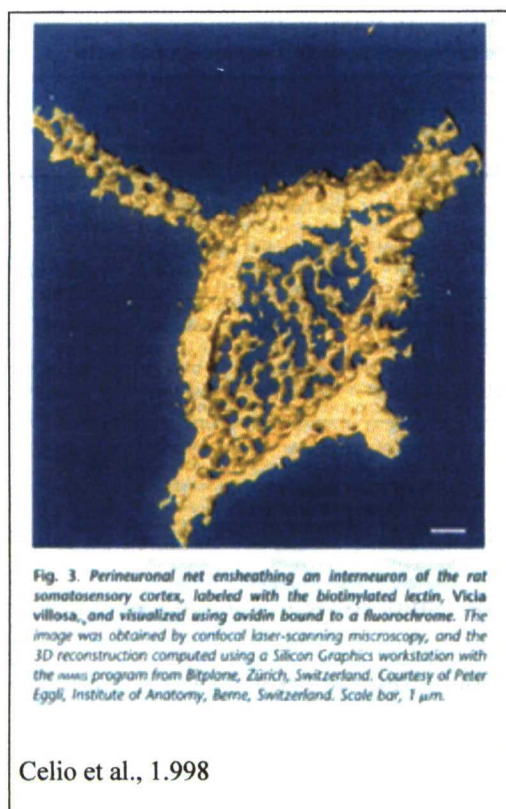
El centro de interés de la matriz extracelular en el sistema nervioso central ha estado y está centrado, sin embargo, en estructuras que aparecen rodeando a algunas neuronas. Estos espacios intercelulares en el sistema nervioso central están ocupados por una matriz extracelular que se caracteriza, desde el punto de vista de su composición química, por la presencia mayoritaria de proteoglucanos con distintos sulfatos formando complejos con hialuronato y tenascina, y también por la ausencia de proteínas fibrosas. En algunas neuronas la matriz extracelular forma estructuras, ya detectadas hace un siglo por Golgi (1.882, 1.893, 1.898) y Ramón y Cajal (1.890, 1.896, 1.897), denominadas redes perineuronales.

Morfológicamente son un recubrimiento reticulado, con aspecto granulado adherido íntimamente a la superficie del soma y a las dendritas proximales, incluyendo el segmento inicial del axón de varios tipos de neuronas (Bertolotto et al., 1.990, 1.991; Brauer et al., 1.982, 1.984; Brückner et al., 1.990; Fujita et al., 1.989; Härtig et al., 1.992; Mulligan et al., 1.989;



Naegele et al., 1.988; Nakagawa et al., 1.986; Zaremba et al., 1.989, 1990). Delimitan unos pequeños compartimentos de forma poligonal a través de los cuales los botones sinápticos van a contactar con la superficie de las neuronas (Palay y Chan-Palay, 1.974). Actualmente se las

considera una acumulación de la matriz extracelular en la superficie de la neurona en la que están embebidas prolongaciones de astrocitos.



Aunque caracterizadas morfológicamente, estas estructuras siguen siendo, en gran medida, una incógnita. Sólo un limitado número de neuronas repartidas de forma dispersa por los núcleos del encéfalo las presentan y, aunque los tipos de compuestos que las forman son los anteriormente mencionados, presentan gran heterogeneidad bioquímica. Estos hechos han sido el centro de interés en una mayoría de trabajos sobre la matriz extracelular en cerebro de rata. A pesar de ello, no existe una correlación claramente establecida entre redes perineuronales y tipo funcional de neuronas, si

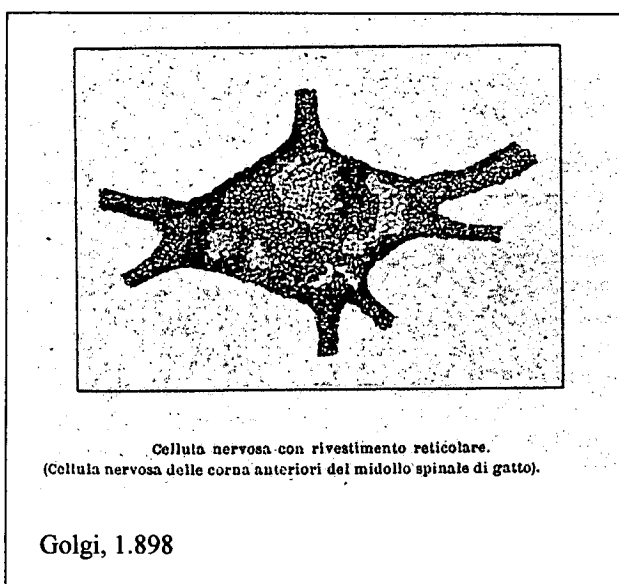
bien la mayoría suelen ser motoras o relacionadas con el movimiento, se han encontrado numerosas interneuronas GABA positivas, con parvalbúmina, y el canal de iones potasio regulado por voltaje donde se detecta la subunidad Kv3.1b (Härtig et al., 2.001). Estas características de colocalización no completa con redes perineuronales puede indicar que sean interneuronas de gran actividad y fisiológicamente de disparo rápido.

No conociendo aún la función de estas estructuras, se apuntan varias hipótesis entre las que cabría señalar la de fijar las sinapsis establecidas e inhibir la formación de nuevas y la de crear un tampón altamente aniónico alrededor de neuronas de disparo rápido de tipo protector. Las redes perineuronales se forman durante el desarrollo postnatal, pero no parece claramente

establecido en qué medida los astrocitos y las propias neuronas contribuyen a la síntesis de los componentes mayoritarios, los proteoglucanos condroitín sulfato. La composición de la matriz extracelular general del encéfalo, aparte de las redes perineuronales, tampoco es homogénea y se especula que podría contribuir a definir o separar núcleos funcionales en el sistema nervioso central. Aunque las redes perineuronales parecen estructuras muy estables a lo largo de la vida, no hay datos sobre posibles variaciones ni en estas estructuras en particular ni en la matriz extracelular del sistema nervioso en general durante el envejecimiento.

2.a.- Las redes perineuronales: Estructura y función.

Las teorías que pretendían explicar la composición y función de las redes perineuronales cambiaron significativamente a lo largo de la historia. Numerosos avances técnicos a finales del siglo dieciocho proporcionaron la base para que pudieran empezar a observarse las redes perineuronales, como el progreso de la manufactura de microscopios, los objetivos de inmersión y los objetivos apocromáticos que aumentaron el poder de resolución, los microtomos refinados y nuevas tinciones como cloruro de oro, azul de metileno vital de Ehrlich, el método de Nissl y la tinción de plata de Golgi.



Las redes perineuronales fueron observadas primeramente por Golgi (1.898) en dos trabajos, uno sobre médula espinal (Golgi, 1.882) y otro sobre el cuarto nervio craneal (Golgi, 1.893). Las interpretó como una especie de almacén o armadura de queratina (Golgi, 1.898). Estas

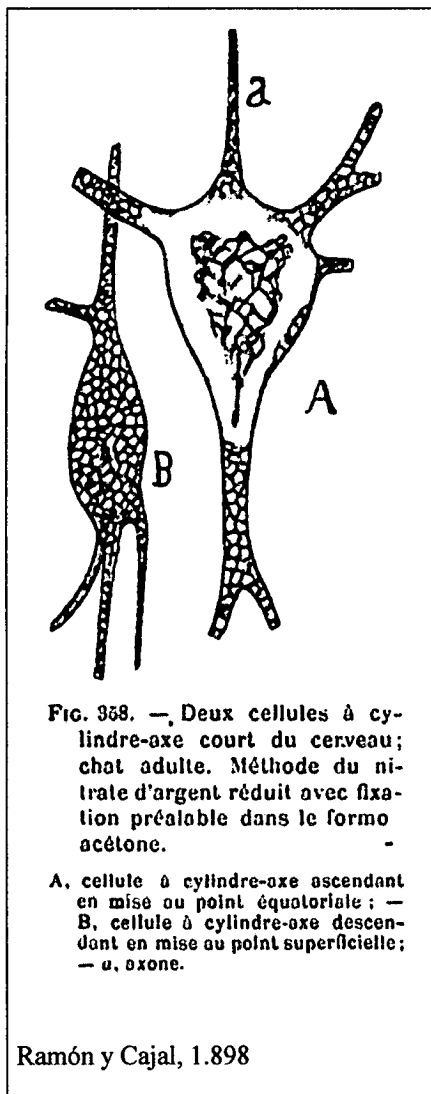
observaciones fueron confirmadas por Lugaro (1.895), Donaggio (1.896) y Martinotti (1.897). Veratti (1.900), pupilo de Golgi, y Donaggio (1.898, 1900, 1901,1903) describen redes perineuronales enfatizando en su continuidad no sólo con la red neurofibrilar interna, sino también con las fibrillas extracelulares.

Otros autores como Meyer (1.896, 1897, 1.899), Nissl, Bethe (1.898, citados por Ramón y Cajal, 1.898) y Held (1.902, citado por Celio y Blümcke, 1.994 y por Celio et al., 1.998) creían que se trataba de prolongaciones anastomosadas que llegaban a la superficie de la neurona procedentes de las arborizaciones de los axones. Bethe (1.900) observó dos redes distintas, las tradicionales redes perineuronales que las llamó “de Golgi” (*Golginetz*) y una red “difusa” (*Fülnetz*) que se situaba sobre células gliales, vasos sanguíneos y fibras nerviosas. Varios autores (Held, 1.902; Von



Economo, 1.906; Besta, 1.910) estudiaron ambas redes y argumentaron que las dos redes se trataban de una parte integral de la organización sincitial de la neuroglía. Ramón y Cajal (1.890, 1.896, 1.897, 1.898) argumentaba contra la opinión de estos autores que no eran más que un artefacto derivado de la coagulación de los fluidos pericelulares. A partir de las afirmaciones de una gran autoridad como Ramón y Cajal, la mayoría de los investigadores del mundo fueron perdiendo el interés por las redes perineuronales y se centraron en otras cuestiones como la base organizativa y funcional del sistema nervioso, cambiando su atención a las neurofibrillas. Sin embargo, el estudio de las redes perineuronales no fue del todo abandonado y algunos científicos siguieron estudiándolas.

Nissl propone la existencia de intersticios en la materia gris que les llama sustancia granulosa. Posiblemente estaba describiendo la matriz extracelular. Ramón y Cajal (1.898) dijo: "... algunas células nerviosas poseen dos capas superficiales: a) una hialina, finísima, sin estructura aparente, situada por fuera del cuerpo celular, ... y b) una red superficial coloreable por el azul de metileno ... " A nuestro entender esta "capa hialina" a la que alude Ramón y Cajal se refiere a la matriz extracelular y la "capa de red" se refiere a prolongaciones de astrocitos. Las redes perineuronales son descritas por Ramón y Cajal con mayor detalle que Golgi posteriormente (Ramón y Cajal, 1.911).



Besta (1.909, 1.910, 1.911, 1932) describió la morfología de las redes perineuronales en diferentes regiones del sistema nervioso en varias especies de mamíferos, incluyendo el hombre. Las examinó bajo condiciones fisiológicas y experimentales produciendo lesiones en el tejido nervioso.

Las redes perineuronales en trabajos clásicos fueron observadas en los axones cortos de interneuronas y, menos frecuentemente, en células piramidales de la corteza cerebral, en el hipocampo, en el núcleo dentado del cerebelo, en el núcleo olivar y en células nerviosas del asta anterior de la médula espinal de muchas especies animales diferentes, incluida la humana. Later (1.897, citado por Lafarga, 1.984) confirma la existencia de las redes en neuronas piramidales de gato con el método de azul de

Con la utilización de los métodos histoquímicos. En 1.959 aparecieron investigaciones que establecían relación entre la acetilcolinesterasa y la sustancia de Nissl (Fukuda y Koelle, 1.959, citado por Mestres y Lafarga, 1.972). La acetilcolinesterasa se sitúa en astrocitos y capilares del cerebro. Pero la teoría del origen glial fue desechada con la caída de la teoría reticular. Sin embargo, en 1.960, gracias a la técnica del ácido peryódico-base de Schiff (PAS), se descubre la presencia de material PAS-positivo alrededor de células nerviosas y el neuropilo de algunos encéfalos de vertebrados. Sin embargo, los investigadores no se dieron cuenta de las similitudes de las antiguas “redes de Golgi” y no las asociaron con estas estructuras. Estas sustancias PAS-positivas eran sustancias cargadas negativamente, como mucopolisacáridos, ahora llamados glucosaminoglucanos, glucoproteínas y ácido hialurónico.

El empleo de técnicas de inmunohistoquímicas han facilitado el reconocimiento de moléculas de forma individual, como ácido hialurónico, versicán, fosfacán, neurocán y otros condroitín sulfatos. Se pudieron identificar otros compuestos utilizándose anticuerpos monoclonales que permitieron identificar moléculas en las redes perineuronales como proteoglucanos condroitín 0, 4 y 6-sulfato, proteoglucanos queratán sulfato y tenascinas. El desarrollo de métodos modernos neuroanatómicos que permiten la observación del sistema nervioso a nivel ultraestructural, y los métodos moleculares que dejan ver la localización histológica de diferentes moléculas, han hecho que las observaciones clásicas hayan sido revisadas y en parte clarificadas.

Desde principios de siglo solamente unos pocos autores habían vuelto a tratar el tema de las redes perineuronales. Debido, quizá, a las técnicas usadas tan aleatorias (tinción de Golgi,

metileno de Ehrlich.

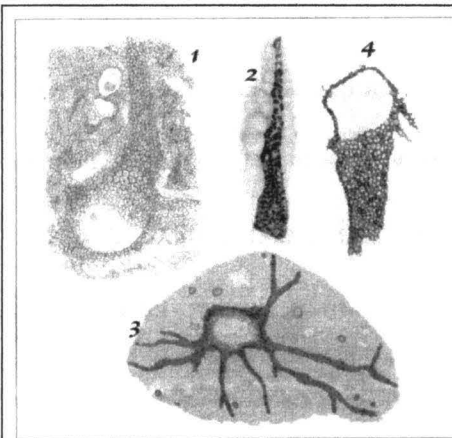
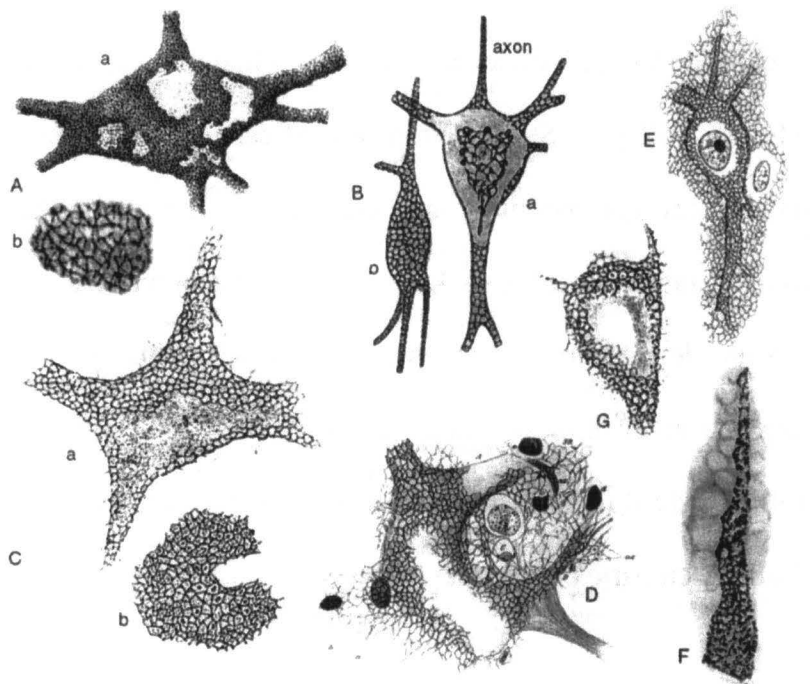


Fig. 4.1-4.4 Drawings from Besta's, Belloni's and Rondinini's papers. The original legends have been slightly modified. 1 Besta [31], Cell of the anterior horn of the spinal cord. Adult dog. Modification of Bethe's method. 2 Belloni [36], Alterations of the pericellular net of a human cortical cell in a case of paralytic dementia. 3 Belloni [36], Cell of the normal human cerebral cortex. 4 Rondinini [39], *Lacerta muralis*. Cell of the mesencephalic trigeminal nucleus. Within the meshes of the net, a typical cartwheel pattern radiating from a central small dot is evident. Filaments originating from the cell surface join the surrounding stroma

Vitellaro-Zuccarello et al., 1.998

Rondinini (1.931) hizo el primer estudio comparativo, en el que demostró que las redes perineuronales eran encontradas en el sistema nervioso central de anfibios, reptiles y aves. En 1.933 Belloni (1.933) llevó a cabo un estudio morfológico de redes perineuronales y “difusas” en corteza cerebral humana normal y en cerebro de fetos de cinco meses. También proporcionó detalles de alteraciones estructurales manifestadas en gran número de cerebropatías degenerativas.

Fig. 1. Perineuronal nets as drawn by various authors at the turn of the century. (A) Nerve cell with reticular covering (anterior horn of cat spinal cord) (a) and (b) enlarged detail of (a) illustrating the fine texture of the perineuronal net. (B) Two cerebral cells with short axons (adult cat), stained with reduced silver nitrate after fixation in formal acetone: (a) cell with ascending axon viewed in the equatorial plane; (b) cell with descending axon viewed in the superficial plane. (C) Nerve cell derived from the anterior horns of the dog spinal cord (a). The cartwheel pattern (raggieri di Donaggio), formed by thin filaments radiating from a central spot, recognizable within the meshes of the perineuronal net (b). These cartwheel structures probably represent shrunken synaptic endings, which occupy the meshes of the net. (D) Cell with Golgi's net and a diffuse net (anterior horn of the spinal cord of a calf embryo), stained according to Bethe's method (Ehrlich's methylene blue and ammonium molybdate). (E) Cortical cell of an adult dog, stained according to a modification of Bethe's method. (F) Alterations within the perineuronal net of a human cortical cell, derived from a patient with paralytic dementia. (G) Cell derived from the nucleus of the vagus (medulla oblongata) of *Lacerta muralis*. Within the meshes of the peripheral apparatus (or perineuronal net), a typical cartwheel pattern radiating from a central small spot is evident. Filaments originating from the (cell) surface connect with the surrounding stroma.

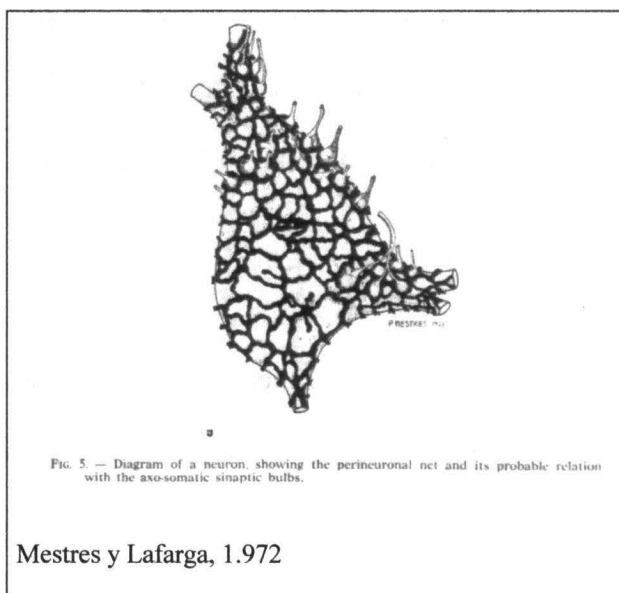


Celio et al., 1.998

tinción vital del azul de metileno de Ehrlich seguida de fijación con molibdato amónico, etc.). Aunque hubo acuerdo respecto a su apariencia entre los neuroanatomistas clásicos, no hubo acuerdo respecto a sus orígenes, composición y función. El estudio de las redes perineuronales se centró en dos vertientes: el componente citológico que serían las prolongaciones citoplásmicas de los astrocitos y más adelante los numerosos componentes de la matriz extracelular.

Las descripciones de las redes en los primeros trabajos se limitaban a unos pocos ejemplos en localizaciones específicas, por ejemplo médula espinal, que contenían neuronas grandes, las cuales se pueden observar usando métodos de tinción clásicos. Sin embargo, los trabajos más actuales se refieren a ejemplos tomados de estas zonas (médula, cerebelo, corteza, etc.). Pero todas las neuronas están rodeadas por un glucocáliz, un recubrimiento de glicoproteínas, glucolípidos y proteoglucanos.

Se estudió la relación que existe entre las prolongaciones astrocitarias que forman la red y los botones sinápticos axo-somáticos con histoquímica por el método de la butiril colinesterasa. Propusieron que las redes perineuronales eran láminas de finas prolongaciones astrocitarias en forma de lamela. Las estructuras

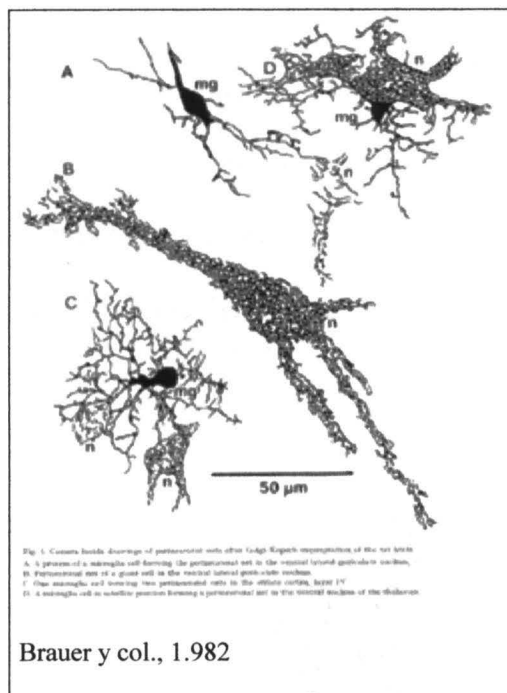


redondeadas o poligonales de la red dicen que eran perforaciones de esta lámina por las que llegan terminales sinápticos a contactar con la superficie de la neurona. (Mestres y Lafarga, 1.972, 1.984; Szentágothai, 1.975)

Las redes perineuronales representan la visualización de un material extracelular en los espacios intersticiales alrededor de las terminaciones sinápticas (Palay y Chan-Palay, 1.974). Las técnicas de microscopía electrónica revelan que estas prolongaciones pueden entrelazarse para formar una red cuya localización puede coincidir con la localización de la matriz extracelular de las redes perineuronales. Gracias a este análisis ultraestructural se pudo observar que las redes perineuronales se correspondían con prolongaciones gliales (Palay y Chan-Palay, 1.974). Por tanto, una posible explicación que dieron a que otras neuronas no tuvieran redes perineuronales sería por la escasa llegada de sinapsis a su soma. Las neuronas postsinápticas que reciben unos pocos contactos sinápticos sobre su soma no pueden mostrar este entramado típico sobre su superficie tan claramente como las grandes neuronas. Las células nerviosas como las del núcleo cerebelar profundo, de gran tamaño, muestran más claramente sobre su superficie las redes perineuronales (Angaut y Sotelo, 1.973; Sotelo y Angaut, 1.973; Lafarga et al., 1.984) al tener mayor superficie para establecer contactos sinápticos.

En 1.990 aparece el primer trabajo que trata de la matriz extracelular como expresión de las redes perineuronales. Este estudio muestra que el proteoglucano condroitín sulfato forma una red extracelular en el sistema nervioso central en la materia gris y blanca. Se observa asimismo un incremento del marcaje en las proximidades de la neurona. La estructura fue detectada en la matriz extracelular y el proteoglucano estaba expresado por astrocitos (Bertolotto et al., 1.990). Los proteoglucanos son los componentes más abundantes presentes

en la matriz del sistema nervioso adulto normal. Otros componentes como fibronectina, laminina y colágeno están confinados a la estructura vascular.



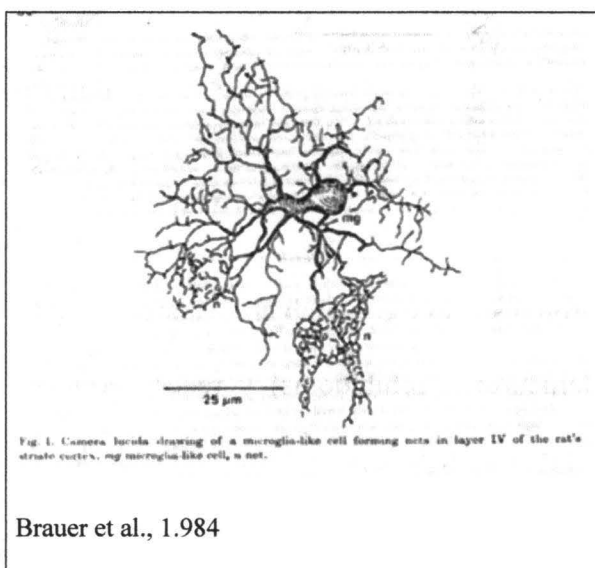
Las redes perineuronales se encuentran preferentemente alrededor de determinados tipos de neuronas. Se ha demostrado una relación entre neuronas parvalbúmina positivas y la aparición de redes perineuronales en su superficie (moléculas de matriz extracelular de las redes perineuronales) (Kosaka, 1989, 1990; Lüth et al., 1992; Naegele y Barnstable, 1991; Brauer et al., 1993). Utilizando dobles marcajes contra moléculas de matriz extracelular de las redes y contra ciertos

neurotransmisores, también apareció una relación entre neuronas GABAérgicas (interneuronas inhibitorias) y redes perineuronales en su superficie (Celio, 1986). Se ha encontrado en la matriz extracelular de las redes perineuronales de neuronas parvalbúmina positivas que tienen también una gran cantidad de tenascina. También se propone que la tenascina es el mayor componente de estas redes en corteza cerebral (Celio y Chiquet-Ehrismann, 1993). Esta asociación de neuronas con determinadas características bioquímicas o fisiológicas con la aparición de redes en su superficie, todavía no está aceptada (Seeger et al., 1994). Este rechazo proviene de que se detectaron redes en neuronas sin las características anteriores citadas.

Las redes aparecen durante el desarrollo postnatal (Nakagawa et al., 1987; Schwartig et al., 1987; Schweizer et al., 1993). La mayor parte de las proteínas que existen en la matriz

extracelular de las redes perineuronales no van a estar, por tanto, implicadas en funciones del desarrollo como: proliferación, migración, diferenciación, etc. Se establece la matriz extracelular típica de las redes alrededor de la tercera o cuarta semana después del parto. Esto ocurre cuando la consolidación de la relación íntima entre la superficie neuronal, la matriz extracelular y los astrocitos está concluida. En este tiempo se consolidan las propiedades fisiológicas maduras de las neuronas que delinean y marcan la terminación del período de plasticidad, estableciendo sinapsis estables y completando la mielinización. Es probable que la aparición de estas moléculas de la matriz extracelular de las redes perineuronales pueda ofrecer un ambiente óptimo para el funcionamiento de las neuronas.

Brauer et al., (1.982) al igual que Mestres y Lafarga (1.972) proponen cuatro funciones que realizan las redes perineuronales: a) factor estabilizador del tejido neuronal, b) especial adaptación a requerimientos metabólicos, c) eliminación de productos metabólicos finales y d) garantiza unas grandes zonas de contacto con las neuronas.



Dos teorías se propusieron como posible origen morfológico de las redes perineuronales: una que se forman a partir de la glía y otra de las neuronas. Los grupos de Brauer (1.984), Steindler y Cooper (1.986) demuestran, gracias a la utilización de lectinas, la presencia de N-acetil galactosamina (componente de glucoproteínas) en las redes perineuronales. El uso de anticuerpos contra proteoglucanos permitió la localización de distintas formas de condroitín sulfato en situación perineuronal. Empleando anticuerpos contra ácido hialurónico o

hialuronectina se vio la existencia de este compuesto de la matriz extracelular en las redes perineuronales. Más recientemente se han detectado glucoproteínas de matriz extracelular como tenascina-C y tenascina-R en los alrededores del soma de neuronas en cerebro de mamífero correspondiendo a la localización de redes perineuronales.

Se sabe que la matriz de las redes perineuronales se componen de la acumulación de tres clases de sustancias fibrosas: ácido hialurónico, glucoproteínas y proteoglicanos. Debido a que se detecta la presencia de algunas moléculas clásicas de matriz en redes perineuronales (Celio y Blümcke, 1.994), proponen que se llamen redes perineuronales de matriz extracelular.

Las glucoproteínas, proteoglucanos y el ácido hialurónico de las redes son producidos por células gliales o por células nerviosas (Brückner et al., 1.993). Tenascina-C (citotactina, janusina, glucoproteína-J1) y ácido hialurónico son sintetizados por las células gliales (French-Constant et al., 1.986; Rieger et al., 1.986). Los proteoglucanos incluido el condroitín sulfato pueden ser producidos "in vitro" por ambos tipos de células, nerviosas y gliales. En astrocitos, oligodendrocitos y también en unas pocas neuronas por técnicas de hibridación "in situ" se ha visto la presencia de ARNm para tenascina-R (restrictina) y para tenascina-C (janusina). Parece ser que el glucoconjugado que es reconocido por lectinas que detectan N-acetil galactosamina aparece marcado en el aparato de Golgi de la neurona. Ello sugiere que el glucoconjugado es sintetizado por las neuronas vía aparato de Golgi para que luego se transfiera a la superficie donde se expone hacia el espacio extracelular. De esta forma el microentorno intersticial que se forma alrededor del soma de la neurona puede ser secretado desde células gliales como astrocitos y neuronas postsinápticas para formar las redes

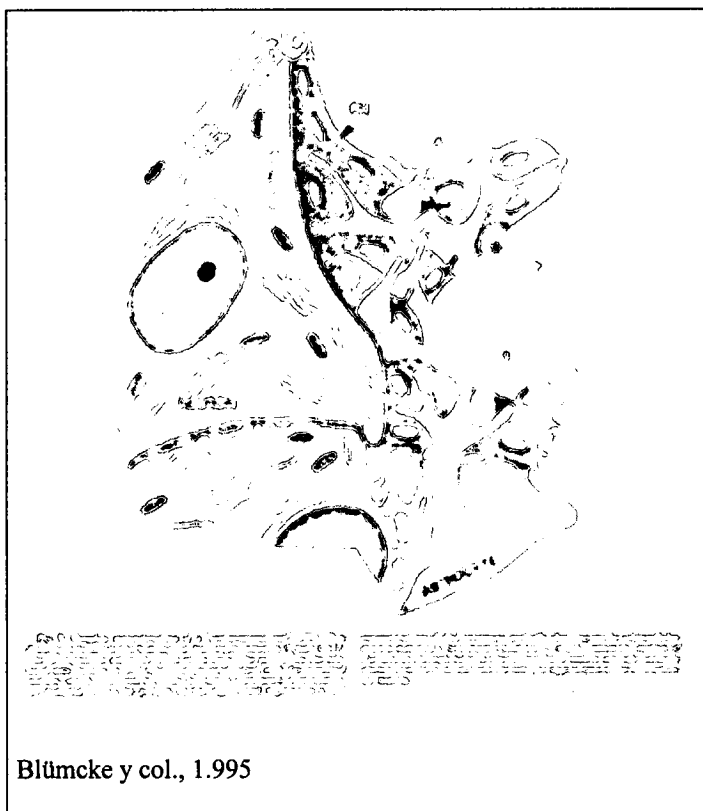
perineuronales (Brückner et al., 1.993). Esta matriz extracelular tan especializada tiene un marcado carácter polianiónico. (Brückner et al., 1.993; Celio y Blümcke, 1.994).

El marcaje de la matriz extracelular con lectinas vegetales ha supuesto un gran avance en el estudio de las redes. El término de lectina fue introducido por Boyd (1.963) y es aplicado a proteínas o glucoproteínas extraídos de plantas, invertebrados y vertebrados inferiores que se unen a azúcares específicamente (Sharon y Lis, 1.972). La red perineuronal que aparece marcada con lectinas tiene el aspecto típico de estas estructuras, un fino recubrimiento reticular. Este es el caso de la lectina de la *Wisteria floribunda* y de la *Vicia villosa* que marcan, en general, bien estas estructuras. Estas aglutininas marcan específicamente N-acetil galactosamina, habiendo gran cantidad de esta sustancia en la matriz extracelular de las redes perineuronales (Härtig et al., 1.992). A nivel ultraestructural, los glucoconjugados señalados por las lectinas y las moléculas reconocidas por los anticuerpos son excluidas de la hendidura sináptica. El producto de la reacción se encuentra en el espacio extracelular, en la superficie de la neurona y en las prolongaciones de los astrocitos (Celio y Blümcke, 1.994).

De esta forma, las redes perineuronales son un lugar de expresión local de moléculas de adhesión celular y de moléculas de la matriz extracelular destinadas a reforzar las interacciones entre las neuronas y las células gliales. Muchos autores coincidían en decir que la sustancia señalada por las lectinas y los anticuerpos contra matriz extracelular se corresponden con las observaciones de Brauer et al. (1.982, 1.984) con el método de Golgi, Creyendo estos autores que se originaban de células de microglía y astrocitos. Pero estudios que comparaban métodos de microscopía óptica, con el método de Golgi, encontraron que el producto de reacción se localizaba extracelularmente y no dentro de las prolongaciones gliales (Atoji et al., 1.989).

El centro de interés en la matriz extracelular del sistema nervioso se está desplazando a las redes perineuronales, estructuras formadas por elementos de matriz extracelular altamente concentrados y especialmente organizados alrededor del soma, dendritas proximales y segmento inicial axónico de algunas neuronas.

La interacción de astrocitos y redes perineuronales se estudió por inyección de material



Blümcke y col., 1.995

fluorescente a astrocitos *in vivo* (Blümcke et al., 1.995). Se comprueba que astrocitos protoplásmicos tienen contactos con redes perineuronales, contactando de una a tres prolongaciones de los mismos. La mayor parte de éstos contactaban también con otras neuronas que no se marcaban con aglutininas y que resultaban ser grandes neuronas piramidales. Se observó que estas células contactaban

asimismo con vasos sanguíneos y redes perineuronales. No todas estas estructuras estaban cubiertas por las prolongaciones de los astrocitos marcados, aunque pudieran estar el resto cubierto por astrocitos no marcados, dando sensación de pseudoanastómosis como en las tinciones de plata de Golgi. Por lo que se demostró que no existe anastómosis de prolongaciones de astroglía en la formación de las redes perineuronales. Además se confirmó

que las redes perineuronales y las prolongaciones de astrocitos protoplásmicos son dos entidades distintas, apostando por el carácter de matriz extracelular de estas estructuras.

Estudios de la relación espacial de los componentes de la matriz extracelular y astrocitos fueron caracterizados a nivel regional y celular por la histoquímica de lectinas e inmunocitoquímica contra glutamina sintetasa y proteína S-100 en neocórtex e hipocampo de rata (Derouiche et al., 1.996). En dobles marcajes se encontraron marcajes en las prolongaciones astrocitarias glutamina sintetasa positivas y tinción de lectinas de redes perineuronales. Se confirmó que una sola neurona puede recibir contactos en forma de redes perineuronales desde varios astrocitos y que un único astrocito puede contribuir a formar redes perineuronales de más de una neurona. En general, el marcaje proporcionado por las lectinas coincide con el de los astrocitos, pero existen zonas en las que no ocurre lo anterior, como en la zona CA1 de hipocampo y en el núcleo reticular talámico (Derouiche et al., 1.996). A microscopía electrónica el marcaje de lectinas de *Vicia villosa* y *Glicine max* en corteza visual de gato aparece en las proximidades de terminaciones sinápticas en soma y dendritas proximales de células no piramidales y están asociadas con prolongaciones astrocitarias recubriendo las estructuras sinápticas (Schweizer et al., 1.993).

Las redes perineuronales fueron consideradas como artefacto, consecuencia de una reducción o dislocación de sustancias o componentes de la matriz extracelular durante la fijación (Ramón y Cajal, 1.898). La inyección de la aglutinina de la *Wisteria floribunda* fluorescente en astrocitos muestra las lectinas marcando *in vivo* estas estructuras, que también son inmunorreactivas en tejido fijado (Härtig et al., 1.994; Brückner et al., 1.996). De esta manera quedó demostrada que estas redes son detectadas tanto en tejido fijado, como *in vivo*.

Se confirma, por tanto, que estas estructuras no son un artefacto producido por la coagulación de la matriz extracelular por la fijación.

Muchos autores siguen considerando las redes perineuronales formadas por dos estructuras superpuestas (Viggiano et al., 2.000). Una externa consistente en terminaciones astrogliales o redes perineuronales de glía, pues son estas células las responsables de sintetizar la mayoría de sus componentes, y otra compuesta de moléculas de matriz extracelular o redes perineuronales de matriz extracelular. Se propuso además una tercera estructura superpuesta más, además de las prolongaciones de astrocitos y la matriz extracelular, era el citoesqueleto de la neurona. Se decía que podría ser un prerequisite de organización de las redes perineuronales de matriz extracelular y que podía tener alguna función relacionada con el área de contactos sinápticos al colocarse y superponerse con las redes perineuronales. Sin embargo, los resultados obtenidos por investigadores indican que el citoesqueleto relacionado con la membrana está determinando la posición de las proteínas transmembrana pero no para anclar las redes perineuronales. Cuando se destruye la matriz extracelular no se altera el citoesqueleto asociado a membrana. (Haunsø et al., 2.000)

La presencia de matriz extracelular en el cerebro aunque escasa (Rouslahti, 1.996), está establecida sin lugar a dudas (Hockfield y McKay, 1.983). Está constituida por hialuronato, proteoglucanos con condroitín sulfato y tenascinas R y C (Celio y Blümcke, 1.994; Celio et al., 1.998; Haunsø et al., 2.000). Además de gran cantidad de glucoproteínas (Kosaka et al., 1.990) se han detectado en las redes perineuronales (Bertolotto et al., 1.996).

Con marcajes gracias a la histoquímica del hierro coloidal y fucsina paraldehído de estas estructuras en corteza retrosplenial, varios autores (Murakami et al., 1.997) han

encontrado un motivo más de heterogeneidad en su composición. Se encontró que el 90 % de las neuronas no presentaban redes perineuronales. Incluso con intensificadores del hierro coloidal con la plata de Bodian (Hong et al., 2.000). Del 10 % restante el 75 % colocalizan estas estructuras marcadas con lectinas y hierro coloidal. Sin embargo, el 25 % que queda, se detecta las redes con lectinas y no lo hacen con hierro coloidal. Estos diferentes marcajes de implican distintas composiciones o estado funcional de las redes perineuronales. También se han detectado redes perineuronales con azul de metileno y no con la aglutinina de *Wisteria floribunda*, y viceversa. La correlación no es completa. Similares resultados fueron obtenidos en neuronas de humanos, ratas y ratones con esta lectina y otras (*Vicia villosa*, *Glicine max*, etc.) (Murakami et al., 1.999). Otros estudios muestran la gran heterogeneidad (Haunsø et al., 1.999) de las redes perineuronales porque se detectaron distintas redes con diferentes métodos (Murakami et al., 1.999). La proporción de componentes varían según zonas. Estas diferencias regionales indican una marcada subdivisión funcional (Haunsø et al., 1.999). Viggiano et al., (2.000) por medio de distintos estudios de recuento, observa que las redes perineuronales de matriz extracelular reconocidas por la aglutinina de la *Wisteria floribunda* están asociadas sólo con una fracción de neuronas rodeadas de las redes perineuronales de glía.

Se han podido identificar nuevas redes perineuronales en lugares donde antes se creía que no existían. Se trata de neuronas con redes perineuronales cargadas positivamente. Hasta ahora se habían identificado estas estructuras con cargas negativas. El método empleado por este grupo de investigadores radica en el pH de 8.0 del hierro coloidal para identificar las redes cargadas positivamente, en las otras pruebas utilizaban un pH 1.0 ó 1.5. La morfología de las nuevas redes perineuronales es la misma, pero aparece en distintas neuronas que las otras redes (Murakami et al., 2.001).

Las lectinas de *Vicia villosa*, *Dolichos biflorus*, *Glicine max* (SBA) y *Wisteria floribunda* detectan radicales de N-acetil galactosamina, N-acetil glucosamina (Härtig et al., 1.994) y α -manosa (Beneyto et al., 1.999) respectivamente en las redes perineuronales en neuronas no piramidales (Nakagawa et al., 1.986; Härtig et al., 1.992; Schweizer et al., 1.993; Bignami et al., 1.993; Brückner et al., 1.996, 1.994); no piramidales y piramidales de Betz en mono (Kosaka et al., 1.989) y humano (Bertolotto et al., 1.991); y neuronas piramidales y no piramidales en cobaya (Ojima et al., 1.995). En corteza cerebral en varias especies la aglutinina de *Vicia villosa* marca neuronas piramidales exclusivamente de la capa V de corteza, mientras que neuronas no piramidales son localizadas en capas III y V. En algunas zonas corticales un tercio del marcaje fueron neuronas piramidales (Ojima et al., 1.998).

Además si se trata el tejido nervioso con la enzima digestiva condroitinasa ABC desaparece el marcaje de estas estructuras con la aglutinina de la *Wisteria floribunda*, lo que indica que la N-acetil galactosamina detectada por esta lectina está interaccionando con los proteoglucanos condroitín sulfato (Köppe et al., 1.997; Brückner et al., 1.998). También en hipocampo, después de la aplicación de esta enzima digestiva, a las 2 horas, se reduce

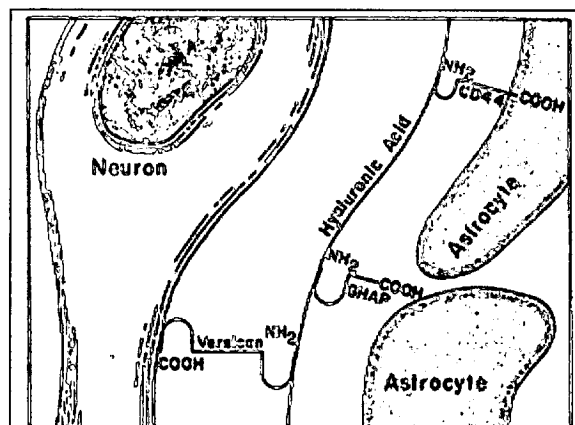


Fig. 3. Hypothetical model of brain ECM. The HA receptor (CD44) binds HA to the astrocyte surface. In turn, versican connects HA to the neuronal (or myelin) surface by binding to HA and to the neuronal (or myelin) surface at its amino- and carboxy-terminal ends, respectively. Cleavage of versican by matrix proteinases generates GHAP which only binds to HA. GHAP is mainly found in white matter and in the granule cell layer of the cerebellum

Bignami et al., 1.993

significativamente el aprendizaje por potenciación a largo plazo. El mismo efecto ocurriría en los mutantes que no expresan tenascina-R (Bukalo et al., 2.001).

El glucosaminoglucano ácido hialurónico aparece en sustancia gris formando agregados sobre la superficie de grandes neuronas detectándose positivamente en las redes perineuronales (Celio y Chiquet-Ehrismann, 1.993; Brückner et al., 1.993; Bignami et al., 1.993). Otros componentes como proteoglucanos con heparán sulfato también han sido identificados en las redes perineuronales (Fluxe et al., 1.994). También forman parte de la matriz extracelular del sistema nervioso central varios tipos de proteoglucanos queratán sulfato (Geisert y Bidansert, 1.993)

Los proteoglucanos condroitín sulfato son de los primeros componentes de matriz extracelular detectados en estas estructuras (Bignami et al., 1.992). Se han detectado además como componentes los tres tipos distintos de condroitín sulfato como son el no sulfatado ó 0-sulfato (Bertolotto et al., 1.996; Köppe et al., 1.997), el 4-sulfato y el 6-sulfato (Köppe et al., 1.997). Con pruebas de digestión enzimática se demuestra que las cadenas de glucosaminoglucanos del 4-sulfato como del 6-sulfato están unidas al núcleo proteico del proteoglucano por un tetrasacárido compuesto por glucuronato, galactosa, galactosa y xilosa en este orden (Margolis y Margolis, 1.989; Köppe et al., 1.997). Los componentes mayoritarios son proteoglucanos condroitín sulfato del tipo lecticanos (Rouslahti, 1.996; Celio y Blümcke, 1.994; Celio et al., 1.998; Yamaguchi, 2.000), alguno de ellos como el brevicán y el neurocán se expresan exclusivamente en cerebro (Yamaguchi, 1.996), mientras que el versicán o el agrecán se expresan en tejido nervioso pero preponderantemente en conjuntivo. Ambos han sido detectados en las redes perineuronales (Oohira et al., 2.000). Proteoglucanos típicos de estas estructuras son versicán y agrecán / Cat-301 (Hockfield y McKay, 1.983; Bignami et al., 1.993; Oohira et al., 2.000). El agrecán en cerebro se relaciona con el condroitín 4-sulfato, pero no con el 0-sulfato ni con el 6-sulfato (Perides et al., 1.992). El

versicán forma agregados con el ácido hialurónico también en las redes perineuronales (Köppe et al., 1.997).

Varios autores que proponen que brevicán, versicán y agrecán forman parte de la constitución molecular de las redes perineuronales (Hagihara et al., 1.999; Oohira et al., 2.000). Existe una fuerte interacción entre el versicán y la tenascina-R en las redes perineuronales (Bignami et al., 1.993) incluso más que con brevicán (Celio y Blümcke, 1.994). Tenascina-R, brevicán y ácido hialurónico se comportan como inhibidores del crecimiento de neuritas (Friedlander et al., 1.994), por ello pueden contribuir a estabilizar las sinapsis formadas en el interior de las redes perineuronales. Otros autores confirman que la tenascina-R interacciona con neurocán y fosfacán (Haunsø et al., 2.000). Y que la tenascina-R es fundamental en las redes perineuronales para que se unan estos dos lecticanos. Si la tenascina-R falla no existe marcaje pericelular de estos dos lecticanos.

También han sido detectados otros proteoglucanos en las redes perineuronales como fosfacán (Haunsø et al., 1.999; Oohira et al., 2.000) que se colocaliza neurocán (Milev et al., 1.998). Este proteoglucano con condroitín sulfato se une a la estructura mencionada por la zona del núcleo proteico mediante la interacción con tenascina-R (Milev et al., 1.998), tenascina-C (Grumet et al., 1.994; Milev et al., 1.997) así como con ácido hialurónico (Margolis et al., 1.996). El fosfacán y neurocán es reconocido por el marcaje de la aglutinina de la *Wisteria floribunda* por su contenido de N-acetil galactosamina (Haunsø et al., 1.999; 2.000).

Se ha encontrado tenascina en estas estructuras (Celio et al., 1.998). Una de ellas, la tenascina-C expresada sobre todo durante el desarrollo embrionario o en procesos

regenerativos, y otra, la tenascina-R, tenascina exclusiva del tejido nervioso, que se expresa en cerebro de adulto (Hagihara et al., 1.999). Se ha demostrado con ratones dobles negativos para tenascina (*knockout TEN-/TEN-*) que la tenascina-R es fundamental para retener en las redes perineuronales neurocán y fosfacán. Sin la presencia de la tenascina-R estos compuestos desaparecen de la matriz extracelular, pero en algunos casos no desaparecen estas estructuras por lo que la tenascina-R, aunque importante, no es fundamental para la existencia de las redes (Haunsø et al., 2.000). De esta forma se demuestra que si falta uno de los componentes de las redes perineuronales, éstas pueden alterarse o incluso desaparecer.

Otro componente de matriz extracelular detectado en las redes perineuronales, es la relina (Pesold et al., 1.999). Se trata de una proteína con analogía estructural con otras proteínas de matriz extracelular que regulan la migración neuronal en el desarrollo de estructuras laminadas en corteza, secretada por las neuronas de Cajal-Retzius en desarrollo. Esta molécula puede conectar moléculas de matriz extracelular con integrinas de la superficie neuronal incluyéndose en la estructura de las redes perineuronales. Además se sabe que el 50 ó 60 % de las neuronas que lo producen son GABAérgicas.

Otra característica que llama la atención es que a pesar de estar todas ellas formadas por agregados de hialuronato, proteoglucanos condroitín sulfato y tenascinas (Celio y Blümcke, 1.994; Celio et al., 1.998; Gan y Kaczmareck, 1.998; Sekirnjak et al., 1.997) las redes perineuronales parecen presentar cierto grado de heterogeneidad en cuanto a los proteoglucanos condroitín sulfato y otros proteoglucanos particulares o en su proporción relativa que las forman (Celio y Blümcke, 1.994; Celio et al., 1.998; Brückner et al., 1.993), lo que podría tener implicaciones funcionales en el sentido de que distintas redes perineuronales podrían definir diversos grupos funcionales de neuronas.

En la matriz extracelular se sabe que aparecen proteínas que unen ácido hialurónico como la familia de los lecticanos: los más importantes, versicán (incluida la variante GHAP – *glial hyaluronic acid-binding protein* -), agregcán, neurocán y brevicán. Los proteoglucanos condroitín sulfato del tipo de los lecticanos posiblemente formen con tenascinas y con hialuronato complejos ternarios (Hagihara et al., 1.999) que serían la base estructural tanto de la matriz extracelular de cerebro en general como de las redes perineuronales en particular.

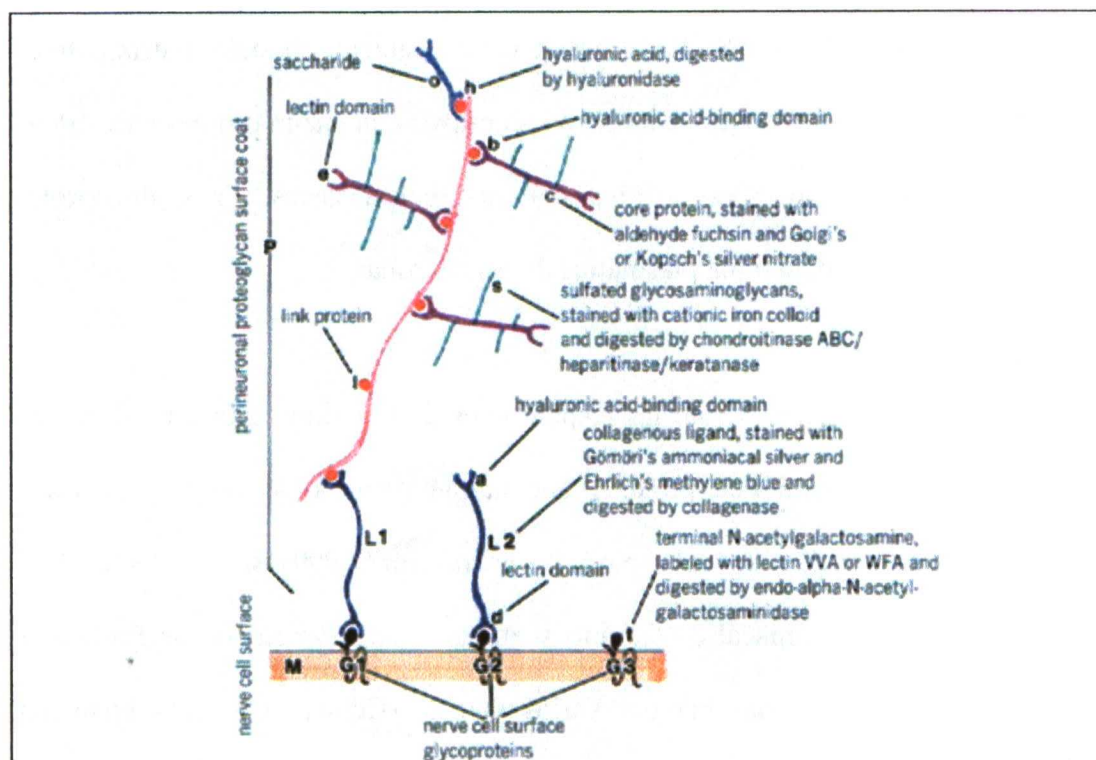


Fig. 5. A revised hypothetical model of perineuronal sulfated proteoglycans and their association with the nerve cell surface. G1-G3 cell surface glycoproteins with terminal N-acetylgalactosamines (t). L1-L2 collagenous ligands with lectin (e) and hyaluronic acid-binding (a) domains. M cell membrane of the nerve cell surface. P perineuronal or extracellular proteoglycan surface coat (b hyaluronic acid-binding domains, c core proteins, e lectin domains, h hyaluronic acid, l link proteins, o oligosaccharides, s sulfated glycosaminoglycans). The collagenous ligands (L) are stained with Gömöri's ammoniacal silver and Ehrlich's methylene blue, and digested by collagenase; core proteins are stained with aldehyde fuchsin and Golgi's or Kopsch silver nitrate; sulfated proteoglycans are stained with cationic iron colloid, and digested by chondroitinase ABC, heparitinase and keratanase; terminal N-acetylgalactosamines (t) of the nerve cell surface glycoproteins are labeled with lectin VVA or WFA, and digested by endo- α -N-acetyl-galactosaminidase. Terminal N-acetylgalactosamines of G1 and G2 nerve cell surface glycoproteins, which are associated or masked with the collagenous ligands or their lectin domains are not digested by endo- α -N-acetyl-galactosaminidase. Lectin domains (e) of the perineuronal proteoglycans may be reactive to terminal N-acetylgalactosamines (t) of G3 nerve cell surface glycoprotein which is free of any connection with the collagenous ligands. Hyaluronic acid-binding domain (a) of the L2 ligand molecule is free of connection with the perineuronal proteoglycans

Murakami et al., 2000

La matriz extracelular de las redes perineuronales está asociada a grandes agregados de proteoglucanos caracterizados por contener cadenas de condroitín sulfato, como 0-sulfato, 4-sulfato y 6-sulfato. Estas cadenas de proteoglucanos de condroitín sulfato contactan con el ácido hialurónico siempre por su núcleo proteico (Köppe et al., 1.997). Proteoglucanos de matriz extracelular son conectados por diversas moléculas a la superficie de las células, y de entre éstas destacan las integritas que a la vez conectan con el citoesqueleto de las células (Jones, 1.996).

Murakami et al., (1.999, 2.001) proponen el siguiente modelo matriz extracelular en las redes perineuronales después de numerosos ensayos con enzimas digestivas y detección de los componentes de matriz extracelular con tinciones clásicas. Unas glucoproteínas que estarían ancladas a la membrana plasmática de las neuronas.

Estas glucoproteínas serían las responsables de la unión de lectinas. Interaccionando con las anteriores estaría una proteína que también uniría las largas cadenas de ácido hialurónico. Estas proteínas “colagenosas” (Murakami 1.999) serían detectadas con los métodos de la plata amoniacal de Gomori y el azul vital de metileno de Ehrlich. Para esta proteína se propone la tenascina por varios autores (Celio y Chiquet-Ehrismann, 1.993; Aspberg et al., 1.997). Otros autores señalan que podría ser una molécula como colágeno tipo III u otra con características similares (Murakami et al., 1.999). Rauch (1.997) apuesta por el brevicán que con un glicosil fosfatidil inositol se ancla a membrana actuando como ligando para conectar la células con el ácido hialurónico. También dice que el fosfacán anclado por un receptor con actividad de tirosina fosfatasa pueda mediar la unión con sustancias que unen ácido hialurónico como por ejemplo tenascinas-C y R, decorina y biglicán en el espacio perineuronal. Y el ácido hialurónico interaccionaría con el núcleo proteico de proteoglucanos

de matriz extracelular característicos de las redes perineuronales. Según Murakami et al. (1.997, 1.999, 2.001), estos proteoglucanos serían detectados con varios métodos, el núcleo proteico con nitrato de plata de Golgi y con fucsina paraldehído, y los glucosaminoglucanos sulfatados con el método del hierro coloidal. En este modelo de organización de matriz extracelular en las redes perineuronales Murakami y col. (1.995, 1.999) proponen que se tienen que diferenciar las redes perineuronales de matriz extracelular de las glucoproteínas de matriz extracelular.

Las redes perineuronales no sólo aparecen en células nerviosas de mamíferos, también aparecen en otros grupos de animales (Murakami et al., 1.994). Murakami et al., (1.994, 1.997, 1.999) han hecho una relación de grupos de animales donde han encontrado estas estructuras usando la técnica del azul de Prusia con el hierro coloidal a pH 1.0 ó 1.5. En mamíferos, se localizan preferentemente en zonas profundas como lámina piramidal y lámina ganglionar. En aves, en corteza cerebral, neuronas piramidales y ganglionares, así como en tronco cerebral (núcleo precomisural principal, núcleo pretectal y otros como el núcleo pontino). En reptiles, en zonas ventromedial y áreas laterales de tronco cerebral y nivel próximo al final caudal en los lóbulos ópticos. No se ha encontrado marcaje en corteza visual. En anfibios, aparece en áreas dorsomediales y dorsolaterales de tronco encefálico a nivel caudal y en cerebelo, no detectándose en lóbulos ópticos. Y en peces, se encuentra marcaje positivo en el área ventral del acueducto de tronco cerebral, no observándose en lóbulos ópticos. En general cuanto más complejo es el animal en la filogenia, mayor número de redes perineuronales (Murakami et al., 1.994).

Estudios en algunos mamíferos, como opossum (*Monodelphis domestica*), no parece seguir la regla que parece general en el resto de mamíferos no marsupiales. En estudios en corteza cerebral (Brückner et al., 1.998) aparecen gran cantidad de neuronas piramidales y no

piramidales marcadas (multipolares, como en otros mamíferos). Pero llama la atención la gran cantidad de neuronas piramidales marcadas, en capas II / III y especialmente en capa V, como ocurre en primates evolucionados y en el hombre. Es tan grande la cantidad de neuronas piramidales marcadas con redes perineuronales que se podría decir que son el 100 %, dando una imagen de capa alineada de marcaje en la capa V de corteza cerebral. Otra característica distintiva de este animal es que no colocaliza su marcaje de redes perineuronales con contenido en parvalbúmina como ocurre en otros mamíferos. Cabe destacar que la organización estructural de la corteza cerebral en opossum es igual que la de otros mamíferos con algunas peculiaridades (Lende, 1.963; Pubols et al., 1.976, citado por Beck et al., 1.996; Beck et al., 1.996). Esta peculiar organización cortical puede ser una muestra de la diferencia en la evolución del cerebro con mamíferos placentarios.

Mapeos de neuronas con redes perineuronales en cerebro de rata detectan una minoría de neuronas distribuidas en más de cien núcleos o regiones (Seeger et al., 1.994; Bertolotto et al., 1996). Se incluyen tanto zonas de neocórtex, como rombencéfalo y hasta médula espinal. En mamíferos, las neuronas piramidales, en general, no poseen redes perineuronales. Aunque de forma puntual en preparaciones de rata o ratón de corteza cerebral aparece alguna de estas células marcada. Sin embargo, cuando se estudian en primates muy evolucionados y en el hombre aparecen gran cantidad de neuronas piramidales marcadas constituyendo estas estructuras. Estas estructuras se detectaron con proteoglucanos de condroitín sulfato (Hausen et al., 1.996). Donde mayor número y más marcadas se encontraban las neuronas piramidales eran en corteza sensorimotora (áreas 1, 2, 3 y 4 de Brodmann). Dentro de estas áreas, se marcan redes perineuronales en neuronas piramidales de capas II / III (proyección intrahemisférica por el cuerpo calloso; Hendry et al., 1.988) y V (proyección corticoespinal), incluyendo las neuronas de Betz. Por tanto, se demostró que se acumulan proteoglucanos

condroitín sulfato en las redes perineuronales en neuronas piramidales en corteza cerebral humana (Hausen et al., 1.996). Por otro lado estudios en corteza cerebral visual de varias especies de mamíferos, incluyendo el hombre, aparecen mucha menor cantidad de neuronas piramidales marcadas (Seeger et al., 1.996; Ojima et al., 1.998). Siendo, por tanto, cuestión no sólo de especies de mamífero, sino también áreas específicas dentro de cada especie la que contiene mayor número de neuronas piramidales marcadas con estas estructuras.

2.b.- Síntesis de las redes perineuronales

En general, tanto neuronas como células gliales, intervienen en la síntesis los componentes de las redes perineuronales, así como la matriz perisináptica (Celio et al., 1.998). Sin embargo, no está lo suficientemente establecido qué tipos celulares contribuyen a la síntesis de cada componente de la matriz extracelular. Según Seeger y col. (1.994), son un tipo especializado de glía los astrocitos los que formarían la red desde sus prolongaciones en las zonas de contacto neurona-glía, y que el proteoglucano condroitín sulfato situado en la matriz extracelular cubre la superficie de neuronas excepto la superficie de sinapsis axosomáticas y axodendríticas.

El marcaje obtenido por las lectinas de *Vicia villosa* y *Glicine max* como redes perineuronales a microscopía electrónica indica que no es sintetizada la N-acetil galactosamina (Bignami et al., 1.993) reconocida por estas lectinas por neuronas. No se encontró el aparato de Golgi marcado pero sí el nodo de Ranvier, esta es la razón por la que Schweizer y col., (1.993) proponer una síntesis por parte de los astrocitos. Las tenascinas parecen ser sintetizadas por astrocitos u oligodendrocitos (Celio y Blümcke, 1.994; Celio et al., 1.998; Faissner y Steindler, 1.995; Lander et al., 1.997). El ácido hialurónico ha sido

demostrado que puede ser producido por células gliales, es decir astrocitos, oligodendrocitos y células de Schwann (Grumet et al., 1.985; Asher y Bignami, 1.991; Celio y Blümcke, 1.994; Faissner y Steindler, 1.995; Le Baron, 1.996; Lander et al., 1.997; Celio et al., 1.998).

Los proteoglucanos condroitín sulfato parecen poder ser sintetizados por astrocitos y neuronas (Celio y Blümcke, 1.994; Celio et al., 1.998; Lander et al., 1.998). En varios casos de proteoglucanos condroitín sulfato se ha demostrado que son producidos por neuronas (Brückner et al., 1.993; Blümcke et al., 1.995; Rambourg et al., 1.993; Lander et al., 1.998). Dada la heterogeneidad de los proteoglucanos condroitín sulfato formando parte de las redes perineuronales y que esta heterogeneidad podría contribuir a definir grupos funcionales de neuronas, podrían ser éstas las responsables de su síntesis (Blümcke et al., 1.995).

El fosfacán es detectado en superficie de neuronas, y en cultivos primarios de neuronas (Oohira et al., 1.994; Maeda et al., 1.995). También se ha detectado en superficie de astrocitos (Engel et al., 1.996; Meyer-Puttlitz et al., 1.996). Estudios de localización por hibridación de ARNm se observa marcaje en neuronas y astrocitos. Por tanto este componente es sintetizado por ambas células (Snyder et al., 1.996).

Los proteoglucanos encontrados en las redes perineuronales en su mayoría son de la familia de los lepticanos, en gran medida con glucosaminoglucanos condroitín sulfato. Dentro de ellos se postula que el versicán pueda estar producido por astrocitos (Bignami et al., 1.993).

2.c.- Patrón de aparición de las redes perineuronales en el desarrollo de la rata

La expresión de los componentes de la matriz extracelular varía a lo largo del desarrollo embrionario y postnatal de rata. Y su correcto desarrollo, o incluso la formación de redes perineuronales, es dependiente de una correcta actividad electrofisiológica (Kalb y Hockfield, 1.988, 1.990; Sur et al., 1.988; Guimarães et al., 1.990; Bertolotto et al., 1.996). La formación de zonas de matriz extracelular engrosadas localmente, o redes perineuronales, (Brückner et al., 1.996) está acompañada por un decrecimiento general en la fracción de volumen extracelular durante el desarrollo postnatal (Van Harreveld, 1.972; Lehmenkühler et al., 1.993). Los marcajes de N-acetil galactosamina con las aglutininas de *Vicia villosa* y *Glicine max* (VVA y SBA) aparecen durante el desarrollo postnatal siguiendo un patrón inverso en corteza cerebral (Schweizer et al., 1.993). Con detección de estas estructuras con hierro coloidal o con la fucsina paraldehído, aparecen en la 2ª ó 3ª semana postnatal, observándose fuertemente marcadas alrededor de la 5ª semana postnatal (Murakami et al., 1.997). Si la detección se hace con la plata amoniacal de Gomori en rata o gato muestran redes producidas por astrocitos satélites durante el periodo de destete en la 3ª o 4ª semana postnatal y las glucoproteínas de membrana reactivas a lectina en la 2ª semana postnatal (Murakami et al., 1.997, 1.999; Tsubouchi et al., 1.996; Hitomi et al., 1.997).

Cuando en el desarrollo aparecen las proteínas que unen hialuronato, cambia la estructura cerebral de la matriz extracelular, se reduce el espacio extracelular y aparece agregación celular (Bignami et al., 1.993). La acumulación de proteoglucanos condroitín sulfato extracelulares en el neuropilo y en las redes perineuronales, revelados por la unión de la aglutinina de la *Wisteria floribunda* y anticuerpos contra proteoglucanos condroitín sulfato es un proceso postnatal continuo más que un acontecimiento transitorio (Köppe et al.,

1.997b). Estos patrones espacio-temporales parecen estar relacionados con la maduración funcional de los sistemas neuronales funcionales, que es evidente en otros procesos de desarrollo como neurogénesis, sinaptogénesis o mielinización de regiones del cerebro (Jacobson, 1.963; Aghjanian y Bloom, 1.967). Bajo estas condiciones de detección, se observa la aparición de las redes perineuronales por primera vez en el día 21 postnatal y toman estructura similar a la de adultos en el día 30.

Algunos autores citan la aparición de la tenascina a partir del día 15 postnatal (Chiquet-Ehrismann et al., 1.986; Solbach y Celio, 1.991; DeLecea et al., 1.996), pero las redes perineuronales no se desarrollan hasta la tercera semana postnatal (Nakagawa et al., 1.987). Ácido hialurónico, fosfacán, neurocán y tenascina-C, presentan altos niveles durante la fase embrionaria y descienden postnatalmente (Bignami et al., 1.993; Köppe et al., 1.997; Milev et al., 1.998). El ácido hialurónico desciende a partir del día 10 postnatal (Delpech et al., 1.987; Margolis y Margolis, 1.989) y aparece como componente común de la matriz extracelular en las redes perineuronales y neuropilo asociado con proteoglucanos producidos principalmente en época postnatal (Delpech et al., 1.989; Bignami y Asher, 1.992). Sin embargo, pueden aparecer fragmentos derivados de proteólisis del neurocán, como el neurocán 130, y localizarse en redes perineuronales en cerebro adulto (Matsui et al., 1.998). El patrón de expresión que se da para versicán, brevicán, agrecán, proteoglucano queratán sulfato y tenascina-R, es la expresión de niveles bajos durante la fase embrionaria que se incrementan en periodos postnatales (Hagihara et al., 1.999; Milev et al., 1.998; Meyer-Puttlitz et al., 1.995; Yamada et al., 1.997). El versicán es el primer gran proteoglucano del tipo de los lepticanos detectado en las redes perineuronales, aparece en el día 21 postnatal en corteza cerebral (Hockfield et al., 1.990; Bignami et al., 1.993). El brevicán se expresa durante el periodo embrionario, pero aumenta fuertemente su expresión en las primeras

semanas postnatales a la vez que las redes perineuronales (Yamada et al., 1.997; Milev et al., 1.998).

No existen datos de variación de estos componentes ligados al envejecimiento aunque las redes perineuronales parecen bastante estables (Celio et al., 1.998). Las redes perineuronales, no presentes en cerebros en desarrollo, aparecen postnatalmente a las tres o cuatro semanas, hacia el final de la plasticidad dependiente de experiencia (Celio y Blümcke, 1.994; Celio et al., 1.998).

2.d.- Correlación entre presencia de redes perineuronales y función neuronal

No ha podido establecerse una correlación satisfactoria o total entre redes perineuronales y tipo funcional de neuronas que las presentan. Neuronas con redes se presentan en múltiples regiones del cerebro, difieren en morfología y en tipo de neurotransmisor.

Numerosas lectinas marcan las redes perineuronales en neuronas piramidales de cobaya (Ojima et al., 1.995, 1.998) y sobre todo neuronas piramidales motoras de Betz en primates como mono (Kosaka et al., 1.989) y en humanos (Bertolotto et al., 1.991). En corteza cerebral, la aglutinina de la *Vicia villosa* en corteza marca neuronas de la capa V cerebral y también de la capa III. También se han detectado neuronas piramidales, conteniendo estas estructuras proteoglucanos condroitín sulfato (Hausen et al., 1.996; Ojima et al., 1.998). Estas neuronas piramidales rodeadas por estas estructuras son fuertemente glutamatérgicas (De Yoe et al., 1.990; Härtig et al., 1.999; Hausen et al., 1.996; Ohiyama et al., 1.997; citados por

Härtig et al., 2001). La variedad de marcajes de neuronas piramidales con redes perineuronales indica una gran heterogeneidad molecular.

La formación de la matriz extracelular de las redes perineuronales no parece estar correlacionada con el tipo de neurotransmisor usado por las terminaciones nerviosas que afectan a la superficie de la neurona en cuestión (Brückner et al., 1993). En núcleo cerebelar profundo, el cual recibe principalmente las terminaciones de las células de Purkinje empleando el neurotransmisor inhibitor GABA han desarrollado bien la matriz extracelular de las redes perineuronales (Brauer et al., 1982, 1984; Lafarga et al., 1984). Pero también las motoneuronas, las cuales reciben principalmente sinapsis glutamatérgicas excitatorias sobre su soma celular tienen estas estructuras muy desarrolladas (Delpech et al., 1982, 1986; Hockfield y McKay, 1983, 1989; Celio y Blümcke, 1994). Así gran parte de neuronas con redes perineuronales parecen implicadas en funciones motoras (motoras autónomas y no autónomas, Seeger et al., 1994) o relacionadas, presentando todas fuerte actividad metabólica y electrofisiológica (Brückner et al., 1993).

Se han encontrado dobles colocalizaciones entre el marcaje de redes perineuronales con la aglutinina de *Wisteria floribunda* y parvalbúmina, aunque la correlación no es completa en ambas direcciones (Brauer et al., 1993). Las neuronas que poseen redes perineuronales suelen ser GABA positivas (Nakagawa et al., 1992; Celio 1993) aunque la correlación no es completa (Brückner et al., 1994). Y más concretamente, estudios realizados en el septo, detectan que estas neuronas expresan el receptor $\alpha 1$ de GABA_A a la vez que expresan parvalbúmina (Brauer et al., 1995). Estas neuronas con redes perineuronales expresan la proteína parvalbúmina, a la vez de ser GABA positivas, en rata y en otros animales (Nakagawa et al., 1986; Kosaka et al., 1990, 1992; Härtig et al., 1992, 1999).

Las neuronas con parvalbúmina pertenecen a una subpoblación de neuronas GABA positivas influenciada por la corriente del ion calcio dependientes del ion potasio. Otros investigadores (Lüth et al., 1.992) indican que neuronas que expresan distintas proteínas ligantes de calcio como calretinina o calbindina, no están rodeadas en principio por estas estructuras. Sin embargo, otros autores han comprobado que la desaparición de la parvalbúmina en el interior de las neuronas no afecta a la morfología de las redes perineuronales. Por lo que se propuso que no eran un factor estrictamente necesario para su formación (Haunsø et al., 2.000). Otros autores han obtenido datos de colocalización también de redes perineuronales y algunas neuronas positivas para otra proteína ligante del ion calcio, la calbindina (Härtig et al., 1.995). También colocalizaron de forma incompleta neuronas calbindina positivas con proteoglicanos condroitín sulfato que ponían de manifiesto también estas estructuras.

La mayoría de estas neuronas con redes perineuronales tienen canales de ion potasio regulado por voltaje de tipo kv3.1b (Skirnjak et al., 1.997; Gan y Kaczmareck, 1.998). En este tipo de neuronas podría actuar como un tampón altamente aniónico que evite la libre difusión de los iones de sodio y potasio. Además también participa el astrocito en el funcionamiento de las redes perineuronales ya que se encarga de la regulación de la concentración de K^+ en el fluido extracelular en el cerebro por almacenamiento local en su citoplasma (Barres, 1.991). Esto contribuye a evitar los efectos despolarizantes del ion potasio y para ello se necesita una matriz extracelular que constituya un medio muy tamponado.

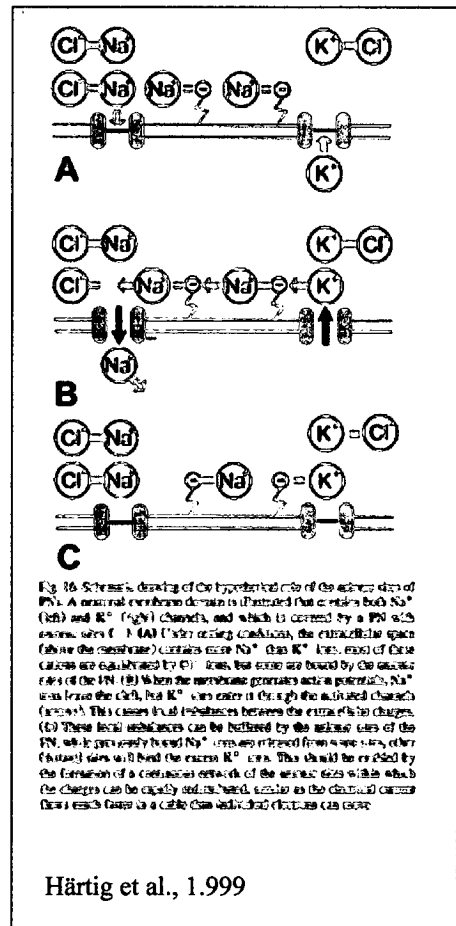
Todo lo anterior parece indicar que se trata de neuronas de disparo rápido (Gan y Kaczmareck, 1.998; Skirnjak et al., 1.997; Härtig et al., 1.999) presentando gran actividad metabólica y electrofisiológica. Las neuronas de disparo rápido o *fast-firing*, poseen las siguientes propiedades: alto potencial de membrana en reposo; baja resistencia a la entrada de

mensajes; cortos potenciales de acción; cortos periodos refractarios o de reposo; alta frecuencia de disparo; y casi constante amplitud en los potenciales de acción.

Por ello, la acumulación de proteoglicanos condroitín sulfatos perineuronales debe ser vista en el contexto de la maduración de la conducción a alta velocidad de neuronas (Köppe et al., 1997b; Härtig et al., 1999). Se ha propuesto que los canales de Kv3.1 de K^+ son los responsables de las propiedades de las neuronas de disparo rápido (Gan y Kaczmarek, 1998). Estudios de dobles marcajes colocan Kv3.1 de K^+ , neuronas con parvalbúmina y GABAérgicas (Härtig et al., 1999). Se realizaron estudios a microscopía electrónica de detección de Kv3.1 de K^+ y aglutinina de la *Wisteria floribunda*. Detectan el canal en la superficie neuronal. Y la lectina fue detectada fuera de la neurona y no directamente

asociada con su superficie, también asociada a la superficie de dendritas y en el neuropilo en espacios extracelulares similares. Dobles marcajes detectaron la aglutinina en la matriz extracelular adyacente a la membrana de neuronas marcadas con este canal (Härtig et al., 1999).

También se detectaron Kv3.1 de K^+ en aferencias de neuronas piramidales de tipo axo-somáticas, siendo estas células negativas para el canal. Así se confirmó que neuronas piramidales en rata con redes perineuronales, no son positivas para el canal Kv3.1 de K^+ , como era de esperar, al no ser neuronas de disparo rápido (Härtig et al., 1999). La existencia

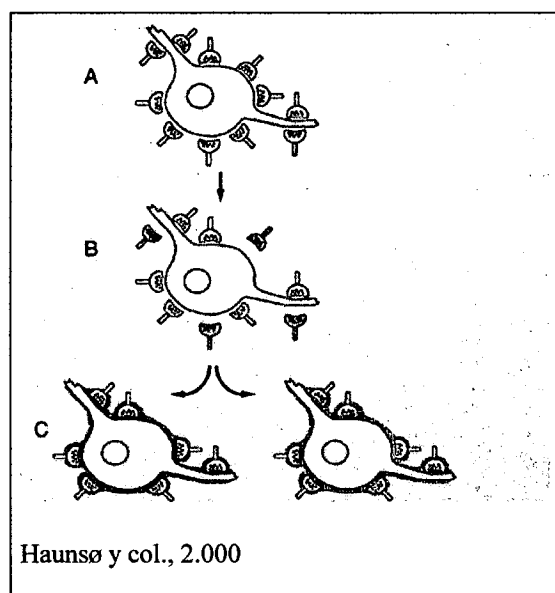


del canal Kv3.1 de K^+ implica la rápida llegada de información por medio de gran cantidad de sinapsis activadas. Y aquí es donde pueden actuar las redes perineuronales, protegiendo las sinapsis y sirviendo de tampón polianiónico para la retención de cationes esenciales para la transmisión del impulso nervioso proporcionando un intercambio rápido de cationes en la matriz extracelular.

Se ha estudiado la despolarización crónica en los cultivos neuornales, impuesta por una elevada concentración de iones K^+ externos, y se ha podido comprobar que esta situación potenciaba la formación de redes perineuronales. De esta forma si se bloqueaban los canales de calcio con cloruro de magnesio o nifedipina, se suprimía el desarrollo de estas estructuras. Sin embargo si se bloqueaban los canales de sodio con tetrodotoxina no aparecían efectos señalables. Con lo que los autores concluían que la diferenciación y formación de las redes perineuronales está regulada por señales dependientes de calcio. (Brückner y Grosche, 2.001)

Se encontraron neuronas con redes perineuronales en el núcleo del cuerpo trapezoide siendo glicina y aspártico inmunorreactivas (Härtig et al., 2.001). De esta manera nos encontramos también neuronas no gabaérgicas con redes perineuronales que poseen otro tipo de neurotransmisores, además la mayoría coexpresaban parvalbúmina y calbindina. Pero muy raramente las que tenían calretinina expresaban estas estructuras. En estas neuronas un hecho nuevo es la llegada de aferencias, elementos presinápticos, de tipo gabaérgicos que se introducían en las redes perineuronales de estas neuronas (Härtig et al., 2.001). Otros autores también han encontrado correlación negativa entre estas estructuras y neuronas. El grupo de Adams et al., (2001) han podido comprobar que todas las neuronas que son colinérgicas nunca presentaban en su alrededor redes perineuronales de matriz extracelular. Y el grupo de Brückner y Grosche (2.001) tampoco encuentran estas estructuras, además de en colinérgicas,

en catecolaminérgicas. Se estudió la expresión de redes perineuronales con la aglutinina de *Wisteria floribunda* colocizándola con diferentes tipos de neurotransmisores (Hobohm et al., 1.998). Se observaron estas estructuras asociadas a neuronas dopaminérgicas, serotoninérgicas y noradrenérgicas en tronco cerebral. Y estaban ausentes en neuronas colinérgicas. De esta forma se encontró que las neuronas catecolaminérgicas no estaban rodeadas por redes perineuronales. Sin embargo algunas neuronas no aminérgicas entre neuronas aminérgicas en el núcleo del rafe, en sustancia negra, parte compacta y en el área tegmental ventral, así como algunas células de la parte reticular de la sustancia negra, se encontraron con redes perineuronales. Se puede decir que la ausencia de estas estructuras alrededor de neuronas aminérgicas de tronco cerebral, también demostrado previamente por neuronas colinérgicas de tronco aparece como un hecho característico común a las células que ejercen funciones de control o modulación lentas, en oposición a las neuronas de disparo rápido que poseen redes perineuronales (Hobohm et al., 1.998).



Así, las propiedades físico-químicas de las redes perineuronales proporcionan la base para el funcionamiento de neuronas con actividad de disparo rápido. Por ello los mapeos hechos para estas estructuras en el cerebro revelan que aparecen en más de 100 núcleos relacionados con funciones motoras (Bertolotto y col., 1.986; Seeger y col., 1.994) son células nerviosas, de lenta modulación, como colinérgicas de

rombencéfalo y aminérgicas están desprovistas de redes perineuronales.

Pero la ausencia de redes perineuronales en neuronas colinérgicas todavía está por demostrar ya que otros autores (Paul y Ulfing, 1.998) han publicado un trabajo en el que encuentran neuronas de este tipo puestas de manifiesto con las aglutininas de *Vicia villosa* y *Peanut*. Se encuentran redes en el núcleo basal de Meinert que es colinérgico, así como en el núcleo tuberomamilar que es histaminérgico.

Otros estudios han detectado la gran heterogeneidad (Haunsø et al., 1.999) de las redes perineuronales porque se detectaron distintas redes con diferentes métodos (Murakami et al., 1.999). La proporción de componentes varían según zonas. Estas diferencias regionales indican una marcada subdivisión funcional (Haunsø et al., 1.999).

La acumulación de versicán, agregcán, brevicán, neurocán y tenascinas detectada en las redes perineuronales, así como otros proteoglucanos contribuyen a la estabilización sináptica. La expresión de estos componentes junto con la aparición de estas estructuras, coincide con la maduración funcional y estabilización de las redes neuronales (Celio y Blümcke, 1.994). También, cuando se une el complejo fosfacán-tenascina-R, promueve el crecimiento axonal y dendritas venciendo el efecto inhibitor de la tenascina-R (Bukalo et al., 2.001). Por ello, los lepticanos y proteoglucanos tienen un papel fundamental en la maduración fisiológica del sistema nervioso así como en su funcionamiento.

Cuando se tratan cortes de tejido de hipocampo con la enzima condroitinasa ABC destruyendo los condroitín sulfato proteoglucanos, se comprueba que se afecta la plasticidad neuronal por potenciación a largo plazo (Bukalo et al., 2001). Por lo que si se destruyen las redes perineuronales de estas neuronas se ven afectadas funcionalmente en la plasticidad.

Los glucosaminoglucanos sirven como modulador del crecimiento de las neuritas durante la formación de redes perineuronales en la formación del sistema nervioso central durante el desarrollo. Se ha demostrado que tanto condroitín sulfato como ácido hialurónico al unirse a dipalmitoil fosfatidil etanolamina promueven el crecimiento de neuritas en dosis dependiente, que llegando a superiores a 1 $\mu\text{g/ml}$ se inhibe el crecimiento (Oohira et al., 2.000). El significado funcional de las redes perineuronales es en gran medida desconocido aunque se las ha asignado varias funciones:

- estabilizar las sinapsis ya establecidas. Posiblemente estabilización mecánica vía enlaces cruzados con moléculas de la superficie neuronal y moléculas de matriz extracelular (Bignami et al., 1.993). También se han encontrado en nodos de Ranvier (Ichimura y Ellisman, 1.991).

- interviene y facilita la plasticidad neuronal por parte de los condroitín sulfato proteoglucanos (Bukalo et al., 2.001) y tenascina (Theodosios et al., 1.997) que componen estas estructuras.

- actuar de barrera repulsiva para establecer nuevas sinapsis (Wintergerst et al., 1.996).

- generar un tampón aniónico alrededor de las neuronas de disparo rápido que evita la libre difusión de los iones sodio y potasio (Bückner et al., 1.994).

- efecto tampón para evitar cambio de pH (Brauer et al., 1.993; Brückner et al., 1.993)

- protección ante altas concentraciones de glutamato, que es neurotóxico por su alta permeabilidad al ion calcio, que es movilizado rápidamente y recaptado por las prolongaciones de astrocitos que están en las redes perineuronales (Celio, 1.993).

- protección ante determinadas toxinas de tipo anticolinérgicas (Roßner et al., 1.995).

- protección de los proteoglucanos condroitín sulfato ante la inducción de muerte celular (Okamoto et al., 1.994; Härtig et al., 1.999).

- concentración de ciertos factores de crecimiento alrededor de algunas neuronas (Flaumenhaft y Rifkin, 1.991)
- modulación en la comunicación del astrocito con la neurona (Celio y Blümcke, 1.994). Y con tenascina unir la matriz extracelular con el citoesqueleto celular en determinados casos (Wintergerst et al., 1.996)
- protección contra la falta de oxígeno, contra la isquemia (Müller, 1.998).
- prevención de la oclusión del espacio extracelular por las propiedades higroscópicas de los proteoglucanos (Celio et al., 1.998).

Determinados datos sugieren que las funciones comúnmente atribuidas a las células gliales, como el mantenimiento de la homeostasis en el microambiente neuronal, puede ser realizada o parcialmente cubierta por la matriz extracelular interpuesta entre ambas células (Brückner et al., 1.996). Se desconoce si la matriz extracelular en el cerebro, dada su heterogeneidad en composición en distintas regiones del cerebro, pudiera contribuir a delimitar o separar distintas regiones funcionales del cerebro.

En conclusión, no se ha llegado a encontrar una correlación definitiva entre las redes perineuronales y el tipo de las neuronas que la poseen. Hasta ahora las colocalizaciones no son completas y se describen posibles papeles de estas estructuras en función de los que tienen los componentes que las forman.

2.e.- Redes perineuronales y patologías.

Los primeros investigadores que se ocuparon de observar las alteraciones morfológicas en condiciones neuropatológicas de las redes perineuronales fueron Nissl

(1.898) y Alzheimer (1.910). Besta (1.911) realizó varios experimentos para crear lesiones agudas y crónicas a neuronas y terminales nerviosas de conejos y perros. Sus investigaciones revelaron que: a.- las redes perineuronales permanecían intactas incluso cuando las neuronas eran fuertemente afectadas por la lesión y también cuando eran destruidas las terminaciones axónicas; b.- las modificaciones en las redes perineuronales aparecen de manera independiente de lo que pasaba en las neuronas. Concluía que eran una verdadera entidad morfológica de origen glial, distinto de las células nerviosas. Donaggio (1931) y Belloni (1.933) estudiaron las redes perineuronales en distintos casos de demencia, heliosis difusa y casos psiquiátricos. Aparecían alteraciones muy patentes desde distinto grado de fragmentación hasta su completa destrucción. Las redes “difusas” Bethe (1.898) aparecen muy disminuidas en distintas áreas del cerebro.

Utilizando anticuerpos Cat-301 estas estructuras han sido investigadas después de manipulaciones experimentales (Hockfield y Kalb, 1.993). Fueron resistentes a todas las condiciones experimentales en el adulto, pero eran altamente susceptibles a los experimentos en periodos de desarrollo postnatal.

Muchos investigadores han hecho estudios de digestión enzimática a componentes de matriz extracelular como hialuronato (Tona y Bignami, 1.993) y condroitín sulfato (Bertolotto et al., 1.995). *In vivo* no han aparecido cambios morfológicos en neuronas y glía, y sólo se han visto afectada la matriz extracelular. Sin embargo, la destrucción de la matriz extracelular puede provocar el cambio de la densidad de carga y de las propiedades hidrodinámicas. Ello puede afectar al metabolismo de la actividad electrofisiológica de neuronas y células gliales, aunque no se manifieste de manera patente en su morfología (Brückner et al., 1.998). La inyección de condroitinasa ABC *in vivo* (Brückner et al., 1.998) en ratas, destruye totalmente

las redes perineuronales. Pero al cabo de 4 semanas, se encontraban parcialmente reconstruidas, y a los 5 meses de la inyección ya no se distinguían las zonas tratadas y las no tratadas en estudios con la aglutinina de la *Wisteria floribunda*. Pero en la zona que fue dañada aparece mayor marcaje de proteoglucano condroitín sulfato que en el neuropilo. La reconstrucción acontece de acuerdo con la ruta metabólica normal de síntesis de cada uno de sus componentes (Lander et al., 1.993, 1.998). Así para los proteoglucanos de condroitín sulfato, tienen un tiempo medio de regeneración de 21 días (Brückner et al., 1.998) y para los almacenes metabólicos de hexosamina de hialuronano un tiempo medio de 9 a 45 días (Margolis y Margolis, 1.977). El cambio medio para el sulfato del condroitín, fue de 7 días (Brückner et al., 1.998; Margolis y Margolis, 1.972). Otros autores también han tratado tejidos vivos con condroitinasa ABC comprobando que al destruir las redes perineuronales de hipocampo se observaba un retardo significativo en la plasticidad por potenciación a largo plazo (Bukalo et al., 2.001). Esto mismo ocurría en ratones que tenían una delección para el gen que codificaba para la tenascina-R. Luego si se afecta cualquiera de los dos componentes de las redes perineuronales, condroitín sulfato proteoglucano o tenascina-R, aparte de la desaparición morfológica de estas estructuras se daña la plasticidad sináptica o al menos un tipo de ella (Bukalo et al., 2.001).

Después de la inyección de hialuronidasa reaparece a los 2 ó 3 días con características típicas (Brückner et al., 1.998). Después de 12 días aparece normal a la tinción (Tona y Bignami, 1.993).

También han sido estudiadas actualmente las redes perineuronales en enfermedades que afectan al sistema nervioso de los humanos.

En la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Belichenko et al., 1.997), y en el síndrome de Rett (Belichenko et al., 1.997), estas estructuras mantienen sus poblaciones de neuronas pero se encuentran modificadas. En la infección por VIH se activa la microglía y aparece secreción de proteasas que pueden digerir la matriz extracelular de las redes perineuronales. Además se sabe que aparece un incremento de la degradación proteolítica de los compuestos de la matriz extracelular, incluyendo los de redes perineuronales, que se han descrito preceden a la neurodegeneración después de sobrevenir dicha infección (Belichenko et al., 1.997,1.999).

Existe fuerte evidencia en deposición anormal de proteoglucanos sulfatados como heparán sulfato, dermatán sulfato y condroitín sulfato proteoglucano en la matriz extracelular como un factor clave en la aparición de lesiones patológicas en la enfermedad de Alzheimer (Goedert et al., 1.996; Snow et al., 1.996). En cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer, no hay disminución de redes perineuronales (Kobayashi et al., 1.989; Yasuhara et al., 1.994). Las neuronas envueltas por redes perineuronales parecen menos vulnerables que las neuronas de proyección colinérgica, sin estas estructuras (Adams et al., 2001). Neuronas que tienen asociadas redes del tronco cerebral pueden tener relación con el desequilibrio funcional relacionado con la falta de neurotransmisores colinérgicos en las degeneraciones semejantes a la enfermedad de Alzheimer ya que estas neuronas no se verían afectadas por la degeneración (Härtig et al., 1.994; Brückner et al., 1.994).

La relación entre los proteoglucanos y la enfermedad de Alzheimer es conocida desde hace tiempo (Crutcher et al., 1.993; Fillit et al., 1.995; Magnus y Stenstad, 1.997; Snow y Castillo, 1.997), en la amiloidosis aparece el proteoglucano de heparán sulfato (Snow et al., 1.989, 1.994) perlecán, y en las placas seniles aparecen queratán (Snow et al., 1.992, 1.989),

dermatán y condroitín sulfatos (DeVitt et al., 1.993; Shioi et al., 1.993, 1.995), así como heparina y heparán sulfato formando compuestos filamentosos helicoidales de tau *in vitro* para prevenir la unión de tau con microtúbulos, y por ello promover el desensamblaje de microtúbulos (Goedert et al., 1.995). Existen gran cantidad de redes perineuronales en corteza cerebral de humanos en corteza motora primaria y en auditiva, y son muy escasas en corteza entorrinal. Y es precisamente ésta última la que se ve más afectada en la enfermedad de Alzheimer. Las neuronas piramidales y no piramidales que tenían estas estructuras no contenían ovillos neurofibrilares, proteína tau fosforilada, (Brückner et al., 1.999; Härtig et al., 2.001). Posiblemente tienen una baja susceptibilidad a la fosforilación por la gran cantidad de proteoglucanos condroitín sulfato en las redes perineuronales (Bückner et al., 1.999; Härtig et al., 2.001). La distribución de estas estructuras es distinta a las alteraciones producidas en el curso de esta enfermedad. Las redes perineuronales pueden proteger de la toxicidad del glutamato (Okamoto et al., 1.994) que presumiblemente interviene en la aparición de la enfermedad (Brückner et al., 1.999). Las redes perineuronales por su composición proporcionan una fuerte evidencia de neuroprotección, disminuye la vulnerabilidad de neuronas a fosforilación de la proteína tau, tiene gran cantidad de receptores de glutamato en membrana las neuronas que las poseen así como proteínas ligantes de Ca^{2+} como parvalbúmina (Härtig et al., 2.001). Por ello hay una bajada significativa de susceptibilidad a la aparición de ovillos neurofibrilares en la enfermedad de Alzheimer en áreas corticales corresponde a neuronas con un microambiente con grandes porciones de agregados de proteoglucanos condroitín sulfatos y por ello, las zonas con más cantidad de estos proteoglucanos en corteza cerebral humana fueron encontrados estar menos afectadas por alteraciones del citoesqueleto en esta enfermedad (Härtig et al., 2.001). Sin embargo, los mecanismos del potencial efecto protector de los agregados de proteoglucanos condroitín sulfato perineuronales quedan por ser descubiertos.

Algunos autores propusieron la desaparición de redes perineuronales en la enfermedad de Alzheimer (Kobayashi et al., 1.989), sin embargo, otros autores argumentan que se tiene que considerar que la detección de las redes perineuronales sea tan baja por los factores de autosilis de las autopsias.

Existen otros tipos de neuronas especialmente vulnerables que muestran ausencia de redes perineuronales, son las dopaminérgicas en la sustancia negra. En el proceso destructivo de estas neuronas para desembocar en la enfermedad de Parkinson, aparece más degeneración en neuronas sin redes. (Yasuhara et al., 1.994; Hobohm et al., 1.998)

En tejido nervioso provenientes de cerebro de pacientes con encefalopatías espongiformes como *scrapie* experimental y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Guentchev et al., 1.998), así como en el kuru y la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (Guentchev et al., 1.999) se han detectado una temprana y fuerte bajada selectiva de la subpoblación de interneuronas inhibitoras GABAérgicas que contienen parvalbúmina (Belichenko et al., 1.999). En la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob la proteína del hospedador, prepriónica, es una sialoglucoproteína que pasa a ser una forma patológica, proteasa resistente y parecida a la anterior, para formar la proteína priónica. Esta conversión aparece en la superficie de la neurona, donde encontramos que las redes perineuronales están implicadas en su pronta desaparición. (Belichenko et al., 1.999). La interacción de la proteína priónica con los compuestos de la matriz extracelular en las redes perineuronales desencadena una serie de acontecimientos desconocidos que culminan con el reemplazamiento de estas estructuras por depósitos insolubles de la proteína priónica. Este cambio en el microambiente de las interneuronas gabaérgicas y parvalbúminas inmunorreactivas puede provocar como proceso

final su muerte (Belichenko et al., 1.999). Por esta razón las neuronas que contienen redes perineuronales son particularmente susceptibles a la infección por priones. Incluso el descenso en detección de estas estructuras es mayor que el de las neuronas que contienen parvalbúmina sin redes. De esta forma se puede explicar los síntomas de excitación típicos de las encefalopatías espongiiformes transmisibles. El daño registrado en estas neuronas no es consecuencia de la severidad local del proceso, sino más bien parece un evento primario. Parece descartarse la actuación de la microglía o astrogía como iniciadores del proceso, ya que con este hecho de la intervención de estas células gliales, no se puede explicar el selectivo ataque de las células con parvalbúmina, sino que la proteína priónica actúa directamente con algún componente de la matriz extracelular de las redes perineuronales. De hecho se sabe que existe un incremento en la degradación proteolítica de los componentes de la matriz extracelular, también las redes perineuronales. Debe ser un sitio crucial para la patogénesis molecular de las enfermedades priónicas transmisibles (Belichenko et al., 1.999). En la enfermedad del insomnio familiar fatal, este descenso en el número de neuronas con redes perineuronales que aparece en las otras enfermedades priónicas transmisibles, no aparece (Guentchev et al., 1.999).

La epilepsia puede ser producida por compuestos altamente básicos en el sistema nervioso. Algunos investigadores han identificado redes perineuronales con fuertes cargas positivas en su composición, es decir muy básicos (Murakami et al., 2.001). Se sabe que compuestos muy básicos como guanidinio son tóxicos y son causas de enfermedades como epilepsia (Mori, 1.987, 1.996; Mori et al., 1.996; ambos citados por Murakami et al., 2.001). Por esta razón una intensificación de compuestos demasiado básicos en las redes perineuronales pueden causar esta patología.

Otras evidencias demuestran que en experimentos “*in vitro*” con condroitín sulfato proteoglucano extracelular rescatan a las neuronas de daños excitotóxicos (Okamoto et al., 1.994). Otros trabajos (Presti y Scott, 1.994) muestran que el ácido hialurónico que se agrega junto con los proteoglucanos en las redes perineuronales colectaban radicales libres en cultivos de fibroblastos de tendón. Existen otras evidencias indirectas del efecto protector que puede tener la matriz extracelular de las redes perineuronales. Se utilizaba antiguamente por los primeros investigadores la tinción del azul de metileno vital para teñir las redes. Actualmente se estudia este marcaje en dichas estructuras (Müller, 1.998). Se interpreta que el marcaje que se obtiene en estas neuronas es posible por su fuerte afinidad al oxígeno intracelular (Müller, 1.995). El azul de metileno es reducido, y por tanto visible, por el oxígeno y radicales libres intracelulares (Lee y Wurster, 1.995). La generación de estas especies reactivas puede ser la razón de la observación de daños en la ultraestructura (Müller, 1.998). Las neuronas de disparo rápido con redes necesitan altos requerimientos de oxígeno y energía para mantener las bombas de membrana y así mantener listo el gradiente electroquímico para la conducción nerviosa. Esta elevada demanda energética produce gran cantidad de radicales libres. Radicales libres que parece ser el origen de muchas enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica, Parkinson o Alzheimer. Müller (1.998) explica el marcaje de las redes perineuronales por parte del azul de metileno porque al ser un compuesto catiónico se ve atraído por las cargas aniónicas de la matriz extracelular. Este mismo autor observa marcaje de azul de metileno en estructuras intracelulares que se afectan por daño de radicales libres, como pueden ser cromatina, microtúbulos y neurofilamentos. Aparte de marcaje en matriz extracelular perineuronal también se detecta tinción en los nodos de Ranvier.

En un futuro se considerarán, a los compuestos de matriz extracelular, junto con proteínas ligantes del ion calcio, los factores de crecimiento y sus receptores, incluidos dentro de estrategias neuroprotectoras de forma altamente específica.

Con la edad aparecen determinados cambios en el sistema nervioso, que en principio no deben asociarse a principios patológicos, sino a un proceso normal de envejecimiento. Se han estudiado diversos parámetros en ratas viejas (Hilbig et al., 2.002). Se ha podido comprobar que en ratas viejas (24-36 meses), aparece un fuerte incremento de lipofuchina y gliosis en áreas corticales, así como pérdida de marcaje en redes perineuronales. Según el trabajo de estos autores han señalado dos grupos de cambios.

a.- El primero, cambios relacionados con la edad. Serían reversibles bajo condiciones ambientales favorables, como un ambiente enriquecido, que mantenga un nivel intelectual activo. Dentro de estos cambios estarían, el marcaje de matriz extracelular, la gliosis astrocitaria, y la fosforilación de neurofilamentos.

b.- El segundo, cambios dependientes de la edad. No serían reversibles, y aparece como un proceso normal de senescencia fisiológica. Dentro de este parámetro se incluiría el progresivo incremento de acúmulos de lipofuchina en el interior de las neuronas.

3.- Matriz extracelular y redes perineuronales en el hipotálamo

Se han publicado muy pocos trabajos referidos al estudio de la matriz extracelular de los núcleos magnocelulares hipotalámicos y los que se han publicado son mapeos generales que incluyen sin centrarse en el hipotálamo.

Se llevó a cabo un mapeo del método del hierro coloidal llevado a cabo por Seeger et al. (1.994). En este trabajo se observa que aparecen redes perineuronales con frecuencia en el área hipotalámica lateral con la histoquímica del hierro coloidal y se detectan redes con la aglutinina de la *Wisteria floribunda* en número moderado. También en otro trabajo (Paul y Ulfing, 1.998) se estudia el núcleo tuberomamilar. En este núcleo catecolaminérgico y con neuronas colinérgicas se describe la existencia de redes perineuronales. Este hecho está contradicho por otro trabajo (Hobohm et al., 1.998) en el que se afirma que las neuronas colinérgicas no tienen estas estructuras.

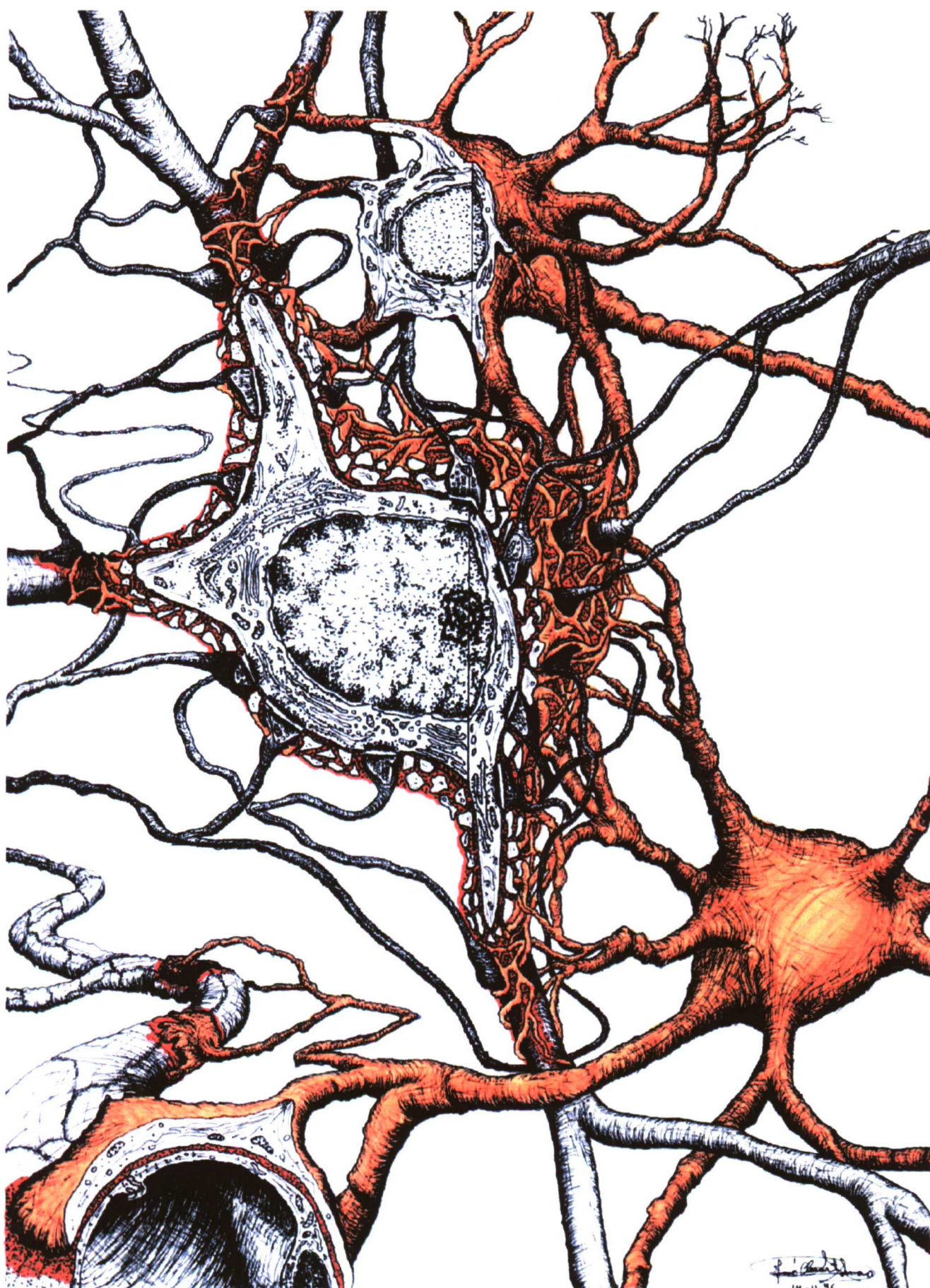
Se han observado acumulación de marcaje de matriz extracelular en los núcleos magnocelulares supraóptico y paraventricular (Theodosis et al., 1.997) en estudios con tenascina. Estos núcleos presentan plasticidad estructural en adultos como respuesta a estímulos fisiológicos como lactancia, parto y sed prolongada (Hatton, 1.990). Durante la estimulación aparecen profundas remodelaciones morfológicas, como son: incremento en la extensión de haces dendríticos (Perlmutter et al., 1.984); formación de sinapsis adicionales (Theodosis et al., 1.981; Hatton y Tweedle, 1.982; Perlmutter et al., 1.984; Tweedle y Hatton, 1.984; Chapman et al., 1.986); formación de uniones tipo GAP (Cobbett y Hatton, 1.984); y cambios en la cantidad de recubrimiento del astrocito en el soma, dendritas o ambos en la neurona. Sin embargo, la mayor parte de estos cambios desaparecen cuando para el estímulo (Hatton, 1.990; Theodosis y Poulain, 1.993). La expresión de tenascina en el núcleos supraóptico es variable, por esta razón se postula que esté relacionada con la plasticidad observada (Singleton y Salm, 1.996).

También aparece en estos núcleos moléculas como el ácido polisiálico. Esta sustancia aparece durante el desarrollo y sólo se conserva en lugares donde existe mucha plasticidad, como en esta zona del hipotálamo (Bonfanti et al., 1.992, 1.996). Así cuando existe activación fisiológica de esta zona se expresa con fuerza el ácido siálico (Theodosia et al., 1.999).

Hasta la fecha no se ha descrito ni sugerido la presencia de redes perineuronales en los núcleos magnocelulares del hipotálamo de la rata y los estudios de matriz extracelular en dicha zona son muy escasos e incompletos.

Se ha empleado el hipotálamo para este estudio por su importante papel funcional en la regulación hormonal en el sistema de control del organismo. La escasez de estudios de matriz extracelular en el hipotálamo obliga a tratar de comprender algo mejor los mecanismos por los que se rige. Además existen indicios de redes perineuronales en el área hipotalámica preóptica en estudios previos. Por presentar estos núcleos plasticidad estructural en adultos (Theodosia et al., 1993, 1997, 1999) son un buen modelo de estudio para encontrar una matriz extracelular especializada como debería corresponder a unas neuronas tan características. También se hacía necesario definir los posibles cambios que suceden en la matriz extracelular en el transcurso del tiempo y estudiar las diferencias con ratas durante la ontogenia, adultas y viejas. Así como estudiar los cambios que pueden aparecer en un estado de activación fisiológica como es la lactancia. Sin olvidar que es una zona de fácil localización y por tanto de estudio.

Modelo de redes perineuronales propuesto



OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo consiste en estudiar la matriz extracelular en los núcleos magnocelulares (supraóptico, paraventricular y preóptico) hipotalámicos de rata en relación a varios marcadores de matriz extracelular. Dado su gran número, hemos limitado el estudio según nuestras posibilidades lo permitieron: proteoglucanos condrotín sulfato, queratán sulfato y tenascina.

Inicialmente hemos pretendido hacer una intensa revisión bibliográfica de los componentes de la matriz extracelular en el sistema nervioso.

Se han identificado determinados componentes y hemos estudiado su evolución.

Se pretende:

a) Determinar las posibles variaciones en la distribución de componentes de matriz extracelular en los núcleos magnocelulares a lo largo del desarrollo postnatal, madurez y envejecimiento.

b) Delimitar temporalmente la aparición de redes perineuronales de tipo clásico en los núcleos magnocelulares de la zona hipotalámica.

c) Establecer el carácter temporal o permanente de la aparición de redes perineuronales maduras estudiadas.

d) Contribuir si es posible, al conocimiento de la participación de la matriz extracelular hipotalámica en la delimitación de zonas funcionales.

e) Estudiar si los núcleos magnocelulares con fuerte plasticidad neuronal presentan una matriz extracelular diferenciada del resto.

f) Contrastar si neuronas magnocelulares con redes perineuronales obedecen al perfil que parecen presentar la mayoría de estas neuronas en otras zonas del cerebro como en corteza.

g) Contribuir a saber si el envejecimiento de la neurona está asociado a cambios significativos en la matriz extracelular.

h) Comparar algunos marcadores de matriz extracelular en rata adulta para encontrar alguna función asociada con la aparición de redes perineuronales.

i) Determinar el origen celular neuronal o glial, si fuera posible, de los distintos componentes de matriz extracelular.

Los resultados de este trabajo podrían contribuir al conocimiento de si la matriz extracelular hipotalámica participa en la delimitación de zonas funcionales, si núcleos con plasticidad neuronal presentan una matriz extracelular diferenciada del resto, si neuronas del hipotálamo con redes perineuronales obedecen al perfil que parecen presentar la mayoría de estas neuronas en otras zonas del cerebro y si el envejecimiento neuronal está asociado a cambios significativos en la matriz extracelular.

MATERIAL

El presente trabajo estudia la matriz extracelular en general, y en particular la aparición de unas estructuras especializadas llamadas redes perineuronales que aparecen únicamente alrededor de algunas neuronas. Se estudia la aparición de marcaje en distintos núcleos magnocelulares hipotalámicos a lo largo del tiempo de desarrollo, en adulto y en la vejez. Se atiende tanto a la morfología de las neuronas teñidas como a la proximidad de astrocitos cercanos a las redes perineuronales. Para este fin se ha empleado como zona de estudio el hipotálamo por la escasez de estudios de matriz extracelular a él referidos, por sus implicaciones en la regulación hormonal, por haber detectado en trabajos preliminares indicios de redes perineuronales en el área hipotalámica preóptica, por la facilidad de localizar los núcleos magnocelulares y por presentar éstos plasticidad estructural en adultos (Theodosis et al., 1993, 1997, 1999).

Se emplearon ratas de la raza Wistar (*Ratus norvegicus*). Las ratas procedían del animalario de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid. Se utilizaron ratas con edades comprendidas entre un día y dos años de vida, tanto machos como hembras.

Tabla de número de ratas utilizadas en este estudio

Estadios	P1	P7	P14	P21	M1	M3		A1	A2	M4 lactancia	
Estudio	mo	mo	mo	mo	mo	mo	me	mo	mo	ge	control
Número	46	22	64	30	62	68	3	10	12	18	15

TOTAL: **362 ratas**

Leyenda:

- mo: microscopía óptica
- me: microscopía electrónica
- ge: grupo experimental
- control: control negativo

MÉTODOS

Las redes perineuronales han sido estudiadas por distintos métodos. Los más antiguos han sido las técnicas clásicas del azul de metileno de Ehrlich (1.886; citado por Müller, 1.998) y la tinción de plata de Golgi (1.873). También hemos aplicado técnicas más avanzadas que pueden aportar mucha más información como son el método del hierro coloidal (Rambourg et al., 1.966), lectinas (Nakagawa et al., 1.986; Härtig et al., 1.992) y anticuerpos contra epítomos de algunas moléculas de matriz extracelular (Celio y Blümcke, 1.993).

1.- Diseño experimental

1.a.- Estudio en el desarrollo, adultos y vejez

Para la realización del estudio en el desarrollo se establecieron cinco estadios. Se decidió el estudio desde el estadio postnatal 1 hasta mes 1, pues estudios previos sobre ácido hialurónico proponían un cambio en los componentes de matriz extracelular alrededor del día 15 postnatal (Oohira et al., 2.000; Yamaguchi et al., 2.000). Se consideró el primer día postnatal (P1) el día del nacimiento. Así, la notación de los estadios estudiados son los siguientes:

- P1 (un día de vida o postnatal 1),
- P7 (siete días de vida o postnatal 7),
- P14 (catorce días de vida o postnatal 14),
- P21 (veintiún días de vida o postnatal 21) y
- M1 (un mes de vida, 30 días).

Para el estudio de adultos se utilizaron ratas de tres estadios distintos. Se comenzó con tres meses de edad al considerarlos adultos desde la edad de inicio de la reproducción, ratas

maduras con un año de edad, se las consideraron maduras, y ratas viejas con dos años. Así tendremos la siguiente notación para los estadios estudiados:

- M3 (rata adulta de tres meses de edad)
- A1 (rata madura de un año de edad)
- A2 (rata vieja o de dos años de edad)

En cada inmunodetección se utilizó un solo anticuerpo. Éste fue aplicado en todos los estadios simultáneamente. En cada estadio se usaron tres cortes de cerebro de rata y cada corte procedía de un animal distinto. Se llevaron a cabo más de seis inmunodetecciones con cada anticuerpo. De esta forma tendremos en cada estadio inmunodetecciones hechas como mínimo en doce animales distintos. Cada cerebro de animal fue elegido de un conjunto de encéfalos de ratas almacenados en un arcón a -70°C . En las secciones hipotalámicas se incluyeron corteza y tálamo en la misma sección transversal como control positivo, pues es una zona bien estudiada de matriz extracelular (Härtig et al., 2001, 1999; Brauer et al., 1999; Brückner et al., 2001; 2000; 1999; Murakami et al., 2001; Celio et al., 1998; Yamaguchi et al., 2000). Como controles negativos se utilizaron los mismos protocolos sin la incubación con el primer anticuerpo.

En la siguiente tabla se muestra el ejemplo de una inmunodetección. En ella podemos ver cómo en cada estadio hay tres ratas distintas. Y en todas las ratas de esta inmunodetección se utilizó un solo anticuerpo.

TABLA EJEMPLO DE INMUNODETECCIÓN

Anticuerpo	P1	P7	P14	P21	M1	M3	A1	A2
1 ^{er} Ejemplar	R1	R4	R7	R10	R13	R16	R19	R22
2 ^o Ejemplar	R2	R5	R8	R11	R14	R17	R20	R23
3 ^{er} Ejemplar	R3	R6	R9	R12	R15	R18	R21	R24

Los anticuerpos utilizados en este estudio así como las concentraciones utilizadas se representan en la siguiente tabla:

TABLA DE ANTICUERPOS

PRIMER ANTICUERPO			SEGUNDO ANTICUERPO		
TIPO	DILUCIÓN	PROCEDENCIA	TIPO	DILUCIÓN	PROCEDENCIA
Mouse C0SPG	1:100	ICN	Bio-Goat Anti mouse IgG	1:100	SIGMA
Mouse C4SPG	1:100	CHEMICON	Bio-Goat Anti mouse IgG	1:100	SIGMA
Mouse C6SPG	1:100	CHEMICON	Bio-Goat Anti mouse IgG	1:100	SIGMA
Mouse KSPG	1:100	CHEMICON	Bio-Goat Anti mouse IgG	1:100	SIGMA
Mouse TEN	1:75	CHEMICON	Bio-Goat Anti mouse IgG	1:100	SIGMA

Leyenda:

- C0SPG: Condroitín 0-sulfato proteoglicano
- C4SPG: Condroitín 4-sulfato proteoglicano
- C6SPG: Condroitín 6-sulfato proteoglicano
- KSPG: Keratán sulfato proteoglicano
- TEN: Tenascina

TABLA DE HISTOQUÍMICAS

HISTOQUÍMICA	TIPO	DILUCIÓN	PROCEDENCIA
WFA biotinilada	Aglutinina	10 µ/ml	SIGMA
PSA biotinilada	Aglutinina	10 µ/ml	SIGMA
NADPHd	Enzima	1 mM	SIGMA
Fe col	Solución	29 %	MERK

Leyenda:

- WFA: Aglutinina de la *Wisteria floribunda*.
- PSA: Aglutinina de *Pisum sativum*.
- NADPHd: Técnica de la NADPH diaforasa.
- Fe col: Técnica del hierro coloidal.

1.b.- Estudio de funcionalidad

Para estudiar la función posible de las redes perineuronales, se realizaron dobles inmunodetecciones de marcaje fluorescente. Se llevó a cabo en un total de seis ratas de tres meses consideradas adultas (M3). Los dobles marcajes relacionaron las redes perineuronales marcadas con la aglutinina de la *Wisteria floribunda* y otros marcadores.

INMUNODETECCIÓN	1 ^{er} TIPO	2 ^o TIPO	3 ^{er} TIPO	4 ^o TIPO	5 ^o TIPO
DETECCIÓN DE REDES PERINEURONALES	WFA	WFA	WFA	WFA	WFA
MARCADOR	PARV	GS	PGFA	ChAT	Cr

- Leyenda:**
- **WFA:** Aglutinina de la *Wisteria floribunda*.
 - **PARV:** Anticuerpo contra parvalbúmina.
 - **GS:** Anticuerpo contra glutamina sintetasa.
 - **PGFA:** Anticuerpo contra la proteína gliofibrilar ácida.
 - **ChAT:** Anticuerpo contra la colín acetil transferasa.
 - **Cr:** Anticuerpo contra calretinina.

1.c.- Estudio de lactancia

Este estudio se llevó a cabo para poder relacionar posibles cambios en el marcaje de matriz extracelular con un estado de activación de los núcleos supraóptico y paraventricular. Varios autores (Theodosios et al., 1997, 1999) han descrito cambios en estos núcleos dependientes de la activación fisiológica. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron dos grupos de ratas hembras de 4 meses de edad (M4). El primer grupo, control, fueron ratas de 4 meses vírgenes. El grupo experimental fueron ratas lactantes, es decir, ratas que estaban dando de mamar a crías, estando estas crías cuando fue sacrificada la madre en el estadio P14.

Las inmunodetecciones fueron hechas a la vez en todos los estadios de la ontogenia, adultos y viejos. Se aplica un anticuerpo sólo en cada inmunodetección, tal y como se describe en el diseño experimental de estudio de desarrollo, adultos y vejez. Se aplicaron todos los anticuerpos utilizados en el estudio anterior para el estudio de lactancia.

2.- Microscopía óptica

2.a.- Anestesia

Todos los animales utilizados en este trabajo fueron anestesiados con éter dietílico por vía respiratoria. Se introdujo al animal en una campana cuya atmósfera estaba previamente saturada de vapores de este compuesto.

2.b.- Perfusión

El proceso se llevó a cabo de manera convencional. Una vez que la rata está anestesiada, se abre la cavidad abdominal localizando el diafragma. Se penetra en el tórax y se introduce una cánula por el ventrículo izquierdo del corazón. Según el tamaño de los animales se empleó una cánula de longitud y sección adecuada. Se pinza el corazón y dejamos fluir el fijador cortando previamente la aurícula derecha para que se complete el circuito. De esta forma pasa el fijador a 4 °C por el sistema circulatorio mayor del animal llegando al interior del cráneo. Se dejó pasar el fijador en la perfusión de 15 a 20 minutos. El fijador utilizado fue una solución de paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato salino (PBS) con una concentración de 0.1 M y pH 7.4 fisiológico.

2.c.- Extracción del encéfalo

Para la extracción del encéfalo se diseca la cabeza a la rata. Cortamos la piel del cráneo. Penetramos cortando las apófisis dorsales de las vértebras cervicales descubriendo la médula espinal. Cuando llegamos a la entrada del encéfalo por el agujero occipital, cortamos a los lados del hueso occipital para no dañar el cerebelo. Cortamos el hueso temporal por la sutura intertemporal y el hueso frontal para dejar libre la parte anterior del telencéfalo incluyendo los bulbos olfativos. Se retiran las meninges, se corta el V par craneal (muy grueso), los nervios ópticos (con sumo cuidado para no arrancar los núcleos supraópticos) y se

separan los bulbos olfativos de la placa cribosa. Disecamos el hipotálamo y para ello cortamos en sección transversal aprovechando desde el principio del quiasma óptico hasta los cuerpos mamilares. Hemos dejado toda la corteza de la sección: corteza parietal, de la ínsula, piriforme. Estas zonas sirvieron de control positivo en la localización de moléculas en la matriz extracelular en el estudio inmunohistoquímico.

2.d.- Procesado del encéfalo

Después de la perfusión y extracción del encéfalo, se realizó una postfijación de los bloques durante toda la noche a 4°C en el mismo fijador. Después de varios lavados en tampón fosfato salino, se procede a su procesamiento para inclusión en parafina o para la congelación de la muestra.

Para la inclusión en parafina, los bloques de muestras del encéfalo se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol. Fueron aclarados con tolueno y posteriormente incluidos en parafina después de varios baños en la misma. Por último se hicieron los bloques de parafina. Los cuales se almacenan en sitios protegidos del calor y de la luz hasta ser cortados.

Para el procesamiento en congelación, previamente hay que crioproteger la muestra. La crioprotección se lleva a cabo con dos baños de soluciones de sacarosa. Un primer baño al 15 % en tampón fosfato salino (PBS) 0.1 M y pH 7.4 durante cuatro horas a temperatura ambiente. Y un segundo baño en al 30 % en PBS toda la noche a 4 °C. Una vez que las muestras están crioprotegidas, fueron congeladas con nitrógeno líquido o con hielo carbónico (CO₂). Las muestras fueron embebidas en medio de inclusión para congelación comercial, Tissue Tek, en un cilindro de papel de aluminio previamente etiquetado. Después de la

congelación del bloque conteniendo la muestra, fueron almacenados en un arcón de congelación de -70°C hasta su utilización.

2.e.- Microtomía

Para cortes en parafina. Se tallaron los bloques y se cortaron con un microtomo Reichert-Jung, modelo 1.130/Biocut. Las secciones de cada corte se hicieron a $7\text{ }\mu\text{m}$. Los cortes se estiraron en baño termostatzado o en plancha a 37 ó 40°C . Éstos fueron recogidos en portaobjetos impregnados en glicerina-albúmina. Y por último, se secaron en el interior de una estufa de 37°C de temperatura constante. Los cortes se seleccionaron y numeraron de forma seriada. Gracias a tinciones simples se pudieron localizar los cortes que contenían los núcleos magnocelulares del hipotálamo, objeto de estudio en esta tesis.

Para cortes en congelación. Los bloques congelados se llevaron del arcón de congelación de -70°C de temperatura al criostato con -20°C . Después de un tiempo para que suba la temperatura en el bloque de la muestra se une el bloque a la mordaza con medio de inclusión comercial. Las muestras fueron cortadas con un grosor de 30 ó $40\text{ }\mu\text{m}$. y se recogieron en portaobjetos sin tratar previamente. Los portaobjetos se seleccionaron en un microscopio de contraste de fases de manera que sólo se seleccionaron los que poseían el núcleo supraóptico y paraventricular. Se numeraron de forma seriada y se almacenaron en el congelador a -20°C hasta su utilización en inmunodetecciones.

2.f.- Tinciones

- Tinciones simples

Se utilizaron tinciones de carácter general para reconocer la localización de los núcleos magnocelulares del hipotálamo, así como para estudiar la estructura general de dichos núcleos. Se usaron dos protocolos, uno para azul de toluidina y el otro para violeta de cresilo.

- Histoquímica:

· Método del hierro coloidal.

Es una técnica histoquímica que se usa para la demostración de moléculas con radicales sulfatados (Hale, 1.946; Martínez-Rodríguez et al., 1.980). Fue empleado para resaltar componentes de matriz extracelular sulfatados. Se obtiene un marcaje similar al de las lectinas como la de la aglutinina de la *Wisteria floribunda* en corteza cerebral (Härtig et al., 1.992, 1.995, 1.999, 2.001; Murakami et al., 1.996, 1.999, 2.001). Este método se cree que tiñen hidratos de carbono similares a N-acetil galactosamina sulfatados, como condroitín sulfato, heparán sulfato, queratán sulfato, etc. Todas ellas típicas moléculas descritas como componentes de las redes perineuronales (Seeger et al., 1.994).

- Inmunohistoquímica

· aglutinina de *Wisteria floribunda*.

Esta lectina, de la casa *Sigma*, tiene un peso molecular de 68 kD, se compone de dos subunidades, se va a unir específicamente al azúcar N-acetil D-galactosamina de proteoglucanos (Kurokawa et al., 1.976) de matriz extracelular. Con esta aglutinina se marcan estructuras que concuerdan con la descripción de redes perineuronales clásicas (Härtig et al., 1.992, 1.994). Por ello se ha utilizado esta lectina para su caracterización en el hipotálamo.

· aglutinina de *Pisun sativum*.

La lectina que se utilizó se obtuvo de la casa *Sigma*. Tiene un peso molecular de 49 kD, está compuesta por 4 subunidades, cada una con dos isotipos α y β ($4(\alpha\beta)^a$) y tiene actividad mitogénica. Se une a las cadenas de glucosaminoglucanos de forma específica siempre que contengan residuos terminales de α -D-manosil y α -D-glucosil. (Trowbridge et al., 1.974)

- Inmunodetecciones

La especificidad del marcaje de las redes perineuronales con los anticuerpos monoclonales contra proteoglucanos condroitín sulfato utilizados ha sido confirmada para distintas especies animales (Fujita et al., 1.989; Bertolotto et al., 1.990; 1.991; Bignami et al., 1.992; Perides et al., 1.992; Murakami et al., 1.994). Estos investigadores muestran que los proteoglucanos sulfato de las redes perineuronales pueden ser encontrados con un tetrasacárido (glucuronosil-galactosil-galactosil-xilosil) (Margolis y Margolis, 1.989) conectando una secuencia de unidades de condroitín sulfato con el núcleo proteico. Se sabe, además, que un lecticano de sistema nervioso como el versicán, detectado también en redes perineuronales (Bignami et al., 1.993), es capaz de unir el anticuerpo utilizado aquí contra proteoglucano condroitín 4-sulfato, pero no se une a 0 y 6 sulfato (Perides et al., 1.992; Köppe et al., 1.997). De esta forma necesita que se trate al tejido con una digestión enzimática parcial utilizando condroitinasa ABC (*Proteus vulgaris*) previamente a la inmunodetección. Así, en las redes perineuronales de matriz extracelular pueden ser marcadas dichos anticondroitín proteoglucanos, indicando que es la unión de la cadena de condroitín sulfato parcialmente digerida, con el tetrasacárido y los aminoácidos adyacentes, los que crean la antigenicidad suficiente para que se unan específicamente estos anticuerpos monoclonales a los distintos

proteoglucanos 0, 4 y 6 sulfato situados en el tejido estudiado. Esto también ha sido postulado para el versicán (Bignami et al., 1.993).

• **Inmunodetección de proteoglucanos condroitín 0-sulfato. (Clon 1-B-5)**

Este anticuerpo de la casa *ICN Biomedicals, Inc*, está purificado por afinidad a partir de líquido sobrenadante de ratón. Para que puedan ser reconocidos los epítomos debe tratarse el tejido previamente con condroitinasa ABC. Por tanto, el anticuerpo reconoce la unión de la cadena de glucosaminoglucano condroitín 0-sulfato a la cadena polipeptídica. Se necesita que sean retiradas el resto de glucosaminoglucanos para que no exista impedimento estérico para la unión del anticuerpo con el epítopo. (Couchman et al., 1984; Sorrell et al., 1988; Fukatsu et al., 1988)

• **Inmunodetección de proteoglucanos condroitín 4-sulfato.**

Este anticuerpo de la casa *Chemicon International, Inc*, está hecho contra proteoglucano de cartílago de ratón digerido con condroitinasa ABC y se ha comprobado que reacciona con ratón y humano ambos fetal y adulto, según la casa comercial. Se sabe que los disacáridos condroitín 4-sulfato inhiben la unión del anticuerpo monoclonal con los proteoglucanos. (Mikecz et al., 1987; Poole et al., 1991; Cs-Szabo et al., 1995)

• **Inmunodetección de proteoglucanos condroitín 6-sulfato.**

Este anticuerpo, de la casa *Chemicon International, Inc*, reacciona con un amplio rango de proteoglucanos de cartílago después de ser digerido con condroitinase ABC o AC, o hialuronasa testicular. El anticuerpo es inhibido en su unión al epítopo por los disacáridos condroitín 6 sulfato. Reconoce condroitín 6-sulfato de alta densidad del proteoglucano de

cartílago de varias especies. No tiene reacción cruzada con dermatán sulfato, queratán sulfato o condroitín 4-sulfato. (Glant et al., 1986; Mickecz et al., 1987; Poole et al., 1991)

• **Inmunodetección de proteoglucanos queratán sulfato.**

Este anticuerpo reconoce 2 ó 3 unidades de disacáridos de cadenas de queratán sulfato tipo II (esquelético) y tipo I (corneal), de forma aislada o unidas a proteoglucanos. El epítipo es resistente a tratamientos proteolíticos o alcalinos y es parcialmente sensible al tratamiento con queratanasa u otras endo-B- galactosidasas. Como inmunógeno se utilizó el proteoglucano de cartílago articular de humano digerido con condroitinasa ABC. Es capaz de reaccionar con varias especies pero no con pollo, dermatán sulfato, ni con proteoglucanos de condrosarcomas de rata. (Thonar et al., 1985; Glant et al., 1986; Hascall et al., 1987; Roughley et al., 1987; Kopper et al., 1990; Poole et al., 1991; Cs-Szabo et al., 1995)

• **Inmunodetección de tenascina-C. (Clon BC-24)**

Este anticuerpo monoclonal contra tenascina tipo C humana pertenece a la casa *Sigma*. Deriva del hibridoma por fusión de células de mieloma de ratón y esplenocitos de un ratón inmunizado. La tenascina humana fue utilizad

3.- Microscopía electrónica

El número de muestras que fue utilizado para el estudio de microscopía electrónica ha sido expuesto en la tabla referente al número de muestras utilizadas para la realización de este trabajo de tesis situado en la primera página del apartado de material.

3.a.- Anestesia y perfusión

Al igual que para microscopía óptica, todos los animales utilizados fueron anestesiados con éter dietílico por vía respiratoria. Se introdujo al animal en una campana cuya atmósfera estaba previamente saturada de vapores de éter dietílico. Cuando la rata quedó anestesiada, se la refrigeró en hielo a 4 °C y se abrió la cavidad abdominal localizando el diafragma. Se penetró en el tórax y se introdujo una cánula por el ventrículo izquierdo del corazón. Se pinzó el corazón y se dejó fluir el líquido cortando previamente la aurícula derecha para que se complete el circuito. Se dejó fluir el fijador en la perfusión de 15 a 20 minutos. El fijador utilizado fue una solución de glutaraldehído al 2 % y paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato salino (PBS) con una concentración de 0.1 M y pH 7.4 fisiológico previamente enfriado hasta una temperatura de 4 °C. Para la extracción del encéfalo se secciona la cabeza de la rata. Se retalló la zona hipotalámica en sección transversal. Después se separa el tálamo y corteza, aislando el hipotálamo. Una vez hecho esto, el hipotálamo se corta por su parte simétrica, por el tercer ventrículo, obteniendo dos piezas iguales.

3.b.- Fijación y lavado

Las piezas fueron fijadas en dos fases. Primero durante 15 a 20 minutos en la perfusión. Segundo durante toda la noche a 4 °C en el mismo fijador. El fijador fue lavado en tampón fosfato salino (PBS) con una concentración de 0.1 M y pH 7.4. La duración del tiempo de lavado fue de una hora y media.

3.c.- Corte con vibratomo

Las piezas de hipotálamo colocadas en vibratomo como prismas, se cortaron en sección transversal (corte frontal), obteniéndose secciones de 100 μm . Dichas secciones fueron recogidas en pocillos con tampón fosfato salino 0.1 M y pH 7.4 de forma seriada. Después se hizo la selección de las secciones en las que estaba incluido el núcleo supraóptico en los que se llevó a cabo el proceso de deshidratación e inclusión en resinas acrílicas a bajas temperaturas.

3.d.- Deshidratación e inclusión

Para realizar la inclusión se empleó como resina Lowicryl K4M debido a las razones siguientes. En experimentos anteriores hemos comprobado que el antígeno de matriz extracelular es bastante sensible a temperaturas altas. El proceso de deshidratación-infiltración y posterior polimerización de la resina (con luz ultravioleta) se llevó a cabo a baja temperatura. De esta manera no se vio afectado en gran medida el antígeno conservando su antigenicidad. El proceso de deshidratación e inclusión se expone más adelante en los protocolos.

3.e.- Microtomía y observación a microscopía electrónica

Los núcleos se localizan en cortes semifinos teñidos con azul de metileno de Richardson, secciones ultrafinas de dichos núcleos se recogieron en rejillas de níquel hexagonales recubiertas previamente con una película de Formvar

4.- Inmunodetección

4.a.- Anticuerpos utilizados para microscopía electrónica

Los anticuerpos utilizados para inmunodetecciones en la tabla siguiente. El protocolo de inmunodetección se incluye en el apartado de protocolos, al final de la sección de métodos de esta tesis.

Tabla de anticuerpos utilizados a microscopía electrónica

Primer anticuerpo				Segundo anticuerpo		
Tipo	Características	Dilución	Procedencia	Tipo y Características	Dilución	Procedencia
C0SPG	mouse IgG	1:75	ICN	Goat anti mouse	1:25	CHEMICON
C4SPG	mouse IgG	1:75	CHEMICON	conjugado		
C6SPG	mouse IgG	1:50	CHEMICON	oro coloidal		

Leyenda:

- C0SPG: Condroitín 0-sulfato proteoglucano
- C4SPG: Condroitín 4-sulfato proteoglucano
- C6SPG: Condroitín 6-sulfato proteoglucano

5.- Micrografías

5.a.- Micrografías ópticas

Todas las micrografías realizadas en este estudio en microscopía óptica convencional y parte de las de fluorescencia fueron realizadas con el fotomicroscopio Zeiss ubicado en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid. Las micrografías de dobles marcajes con fluorescencia, se realizaron con un microscopio Zeiss confocal de triple filtro en el Instituto Paul Flechsig para investigación de Neuroquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Leipzig (Alemania).

5.b.- Micrografías electrónicas

Las micrografías electrónicas fueron obtenidas con un microscopio electrónico de transmisión de 80 KV de la marca Zeiss modelo EM 902, en el Centro de Microscopía Electrónica "Luis Bru" de la Universidad Complutense de Madrid. Este microscopio lleva incorporado un filtro de energía del tipo Castaing-Henry-Ottensmeyer que permite aumentar

el contras de las imágenes; hecho de utilidad en muestras no osmificadas procesadas para realizar marcajes con oro coloidal.

6.- Protocolos

6.a.- Protocolos de histoquímica

6.a.1.- Método del hierro coloidal

Los encéfaloscerebros se fijaron con paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.4 durante toda la noche a 4 °C. Después de lavarlos con el mismo tampón fosfato durante 2 horas, se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol. Se aclararon con dos baños de tolueno. La inclusión en parafina consistió en dos baños de 1 hora antes de hacer los bloques. Los bloques se cortaron a 7 µm y se estiraron en baño termostatzado antes de aplicarlos sobre un portaobjetos previamente tratado con una solución de albúmina-glicerina. El desparafinado sigue un protocolo normal. Se dan varios baños con xileno. Después se hidrataron con baños sucesivos de soluciones de etanol en concentración decreciente. Por último se bañaron los cortes en agua destilada.

El procedimiento para la realización de la histoquímica del hierro coloidal es el siguiente.

1.- Incubación en solución de hierro coloidal (2 horas)

- Solución de hierro coloidal:
 - agua destilada 18 ml
 - ácido acético glacial 12 ml
 - solución stock de hierro coloidal 10 ml
- Solución stock de hierro coloidal:
 - tricloruro de hierro al 29 % 4.4 ml
 - agua destilada hirviendo 250 ml

2.- Lavado en ácido acético al 30 % en agua destilada (3 lavados de 10 min.)

- 3.- Lavado en agua corriente (5 min.)
- 4.- Lavado en agua destilada (dos lavados de 5 min cada uno)
- 5.- Incubar en la solución siguiente durante 20 min
 - Solución de ácido clorhídrico al 2 % 1 ml
 - Ferrocianuro de potasio al 2 % 1 ml
- 6.- Lavado con agua destilada durante 5 min.
- 7.- Tinción de contraste con rojo nuclear o ácido pícrico
- 8.- Deshidratar y montar con cubreobjetos en DPX.

6.b.1.- Método de la aglutinina de la *Wisteria floribunda* y de *Pisun sativum*.

Para la realización de la técnica de las aglutininas se utilizaron cortes que fueron procesados en congelación. El método fue realizado con cortes en suspensión. El protocolo seguido es el siguiente:

- 1.- Inhibición de la peroxidasa endógena con H_2O_2 al 0.03 % en tampón fosfato 0.1 M y pH 7.4 durante 10 min.
- 2.- Lavados en tampón fosfato 0.1M y pH 7.4. Tres lavados de 10 min cada uno.
- 3.- Soluciones bloqueantes:
 - solución de avidina (15 min.)
 - lavado con el mismo tampón fosfato.
 - solución de biotina (15 min)
- 4.- Lavados en tampón fosfato. Tres lavados de 10 min. cada uno.
- 5.- Incubación con la aglutinina de la *Wisteria floribunda* biotinilada a 10 µg./ml. o incubación con la aglutinina de *Pisun sativum* a 10 µg./ml. según el caso durante toda la noche a 4 °C. (Sigma)
- 6.- Incubación con igual solución de aglutinina durante 1 hora a temperatura ambiente (20°C aproximadamente) y en agitación.
- 7.- Lavado en tampón fosfato. Tres lavados de 10 min cada uno.
- 8.- Incubación con el kit ABC de la casa Vector (avidina-Peroxidasa). Durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.
- 9.- Lavados en tampón fosfato. Tres lavados de 10 min cada uno.
- 10.- Revelado. (15 min.)
 - Solución de revelado:

· 3, 3' diaminobenzidina	0'005 g.
· Clorhidrato de Ni	0'1 g.
· Tampón Tris 0.2 M y pH 8.0	25 ml.

Una vez mezclado, disuelto y filtrado se añaden 25 μ l. de H₂O₂ comercial

- 11.- Lavado con tampón fosfato. Cinco lavados de cinco minutos cada uno.
- 12.- Montaje en porta con tampón Tris-gelatina.
- 13.- Secado (noche a temperatura ambiente)
- 14.- Montar con cubreobjetos con DPX.

6.a.3.- Método de la NADPH diaforasa.

Las muestras utilizadas fueron perfundidas vía intracardiaca con un fijador constituido por paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato 0.1 M y pH 7.4. Seguidamente se procede con el procesamiento normal en congelación descrito anteriormente. Se cortan las piezas en secciones de 25 a 30 μ m. y son recogidas en tampón fosfato 0'1 M, pH 7.4 a 4 °C.

- 1.- Lavado de las secciones en tampón fosfato 0.1 M y pH 7.4 para eliminar restos de fijador. Tres lavados de quince minutos cada uno.
- 2.- Lavado de secciones durante 10 minutos en tampón Tris-cha 0.1 M, pH 8.0.
- 3.- Incubar las secciones a 37 °C en agitación constante en la solución siguiente:

· azul de nitrotetrazolio como cromógeno	0.3 mM
· β -NADPH en forma de sal tetrasódica como sustrato	1 mM
· Tritón X-100 como detergente	0.08 %
· Tampón Tris-HCl 0.1 M y pH 8.0 como disolvente	
- 4.- Controlar el curso de la reacción de coloración en el microscopio.
- 5.- Detener la reacción mediante lavados sucesivos en tampón fosfato 0.1 M, y pH 7.4 frío.
- 6.- Montar los cortes en portaobjetos con tampón Tris-HCl y gelatina y dejar secar toda la noche a temperatura ambiente.
- 7.- Montar los cortes con cubreobjetos con DPX.

6.b.- Protocolo de inmunohistoquímica

6.b.1.- Inmunodetección a microscopía óptica

Las inmunodetecciones fueron realizadas con las secciones de tejidos en flotación. Se utilizó como control negativo muestras que siguieron todo el protocolo pero sin la incubación con el primer anticuerpo, que se sustituyó por la solución diluyente del primer anticuerpo. Y como control positivo se utilizó la zona de corteza cerebral y tálamo que existe en la misma sección transversal que los núcleos hipotalámicos a estudiar, pues ya están publicadas muchas pruebas en estas zonas. El protocolo seguido es el siguiente:

- 1.- Inhibición de la peroxidasa endógena con H_2O_2 al 0.03 % en tampón fosfato 0.1 M y pH 7.4 durante 10 min.
- 2.- Lavados en tampón fosfato 0.1M y pH 7.4. 3 lavados de 10 min. cada uno.
- 3.- Tratamiento de digestión enzimática. Es necesario para el caso de los anticuerpos para detectar los proteoglucanos condroitines 0, 4 y 6 sulfato y queratán sulfato. Incubación con condroitinasa ABC (*Proteus vulgaris*) de la casa Sigma. Se usó a la concentración de 0.1 U/ml en tampón Tris-acetato de sodio 40 mM-40 mM y suero bobino (BSA) a 0.01 % en una estufa a 37 °C durante 1.5 horas en placa y cámara húmeda.
- 4.- Lavados en tampón fosfato 0.1M y pH 7.4. 3 lavados de 10 min. cada uno.
- 5.- Soluciones bloqueantes:
 - solución de avidina (15 min.)
 - lavado con el mismo tampón fosfato.
 - solución de biotina (15 min.)
- 6.- Lavados en tampón fosfato. Tres lavados de 10 min. cada uno.
- 7.- Incubación con suero normal de cabra (SNC) al 10 % en tampón fosfato 0.1 M y pH 7.4. durante 1 hora a temperatura ambiente en placa y cámara húmeda.
- 8.- Incubación del primer anticuerpo en suero normal de cabra al 1 % en tampón fosfato 0.1 M y pH 7.4. Se realizó en cámara húmeda a 4 °C durante toda la noche.
- 9.- Lavados en tampón fosfato. Tres lavados de 10 min. cada uno.
- 10.- Incubación con el segundo anticuerpo. Una inmunoglobulina tipo G (IgG) anticuerpo contra ratón hecho en cabra (GAM) que se encuentra biotinilada. Se

disuelve en tampón fosfato 0.1 M y pH 7.4. Se realiza a temperatura ambiente durante 2 horas en placa y cámara húmeda.

11.- Lavados en tampón fosfato. Tres lavados de 10 min. cada uno.

12.- Incubación con el kit ABC de la casa Vector (avidina-Peroxidasa). Durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.

13.- Lavados en tampón fosfato. Tres lavados de 10 min. cada uno.

14.- Revelado. (15 min.)

- Solución de revelado:

· 3, 3' diaminobenzidina	0.005 g.
· Clorhidrato de Ni	0.1 g.
· Tampón Tris 0.2 M y pH 8.0	25 ml.

Una vez mezclado, disuelto y filtrado se añaden 25 µl. de H₂O₂ comercial

15- Lavado con tampón fosfato. Cinco lavados de cinco minutos cada uno.

16.- Montaje en porta con tampón Tris-gelatina.

17.- Secado (noche a temperatura ambiente)

18.- Montar con cubreobjetos con DPX.

6.b.2.- Inmunodetección a microscopía óptica con fluorescencia

Las inmunodetecciones con fluorescencia fueron realizadas con las secciones de tejidos en flotación. Se utilizó como control negativo muestras que siguieron todo el protocolo pero sin la incubación con los primeros anticuerpos, que se sustituyeron por la solución diluyente del primer anticuerpo. Y como control positivo se utilizó la zona de corteza cerebral y tálamo que existe en la misma sección transversal que los núcleos hipotalámicos a estudiar al igual que con la microscopía óptica. El protocolo seguido es el siguiente:

1.- Lavados en tampón fosfato salino 0.1M y pH 7.4. 3 lavados de 10 minutos cada uno. Sin agitación.

2.- Incubación de la solución bloqueante: Suero normal de cabra al 5 % con Tritón X-100 al 0.3 % en tampón Tris salino 0.1 M pH 7.4 con agitación lenta durante 1 hora.

3.- Incubación con el cóctel de primeros anticuerpos. Se diluyen los anticuerpos en suero normal de cabra al 1 % y Tritón X-100 al 0.3 % en tampón Tris salino 0.1 M. La mezcla se agita suavemente durante 30 ó 40 minutos a temperatura ambiente para que

se distribuyan homogéneamente. Los cortes se incuban durante 12 a 48 horas a 4 °C, en agitación suave con cámara húmeda.

- Aglutinina de la *Wisteria floribunda* 5-10-15 µg/ml.
- Con uno de los siguientes:
 - anti-parvalbúmina hecho en conejo (20 µg/ml)
 - anti-acetil colín transferasa hecho en cabra (1:200, Swant)
 - anti-glutamina sintetasa hecho en ratón (1: 500, Sigma)
 - anti-calretinina hecho en ratón (1:300, Chemicon)

4.- Lavados tamón Tris salino, 3 lavados de 10 minutos cada uno.

5.- Incubación con el cóctel de segundos anticuerpos marcados con compuestos fluorescentes. Están diluidos en tampón Tris salino 0.1 M y pH 7.4. La solución se deja mezclar suavemente durante 30 ó 40 minutos en agitación suave. La incubación se lleva a cabo durante 1 ó 2 horas a temperatura ambiente, cámara húmeda y en agitación suave.

- para la aglutinina de la *Wisteria floribunda* biotinilada se utilizaron los compuestos fluorescentes Cy3 ó Cy2 conjugado con estreptavidina.
- para la parvalbúmina se utilizó inmunoglobulina G contra conejo hecho en burro conjugado con el fluorocromo Cy3.
- para la colín acetil transferasa se utilizó inmunoglobulina G contra cabra hecho en burro y conjugado con el fluorocromo Cy3.
- para la glutamina sintetasa se utilizó inmunoglobulina G contra ratón hecho en cabra y conjugado el fluorocromo Cy2.
- para la calretinina se utilizó inmunoglobulina G contra ratón hecho en cabra y conjugado con el fluorocromo Cy2.

6.- Lavados en tampón Tris salino, 3 lavados de 10 minutos cada uno.

7.- Montaje de los portas. Sobre portas tratados con glicerina desde una placa de Petri con ayuda de un pincel. Se pone una gota de solución de albúmina-glicerina en el porta y con agua se estiran en la placa de Petri.

8.- Secado de portas. Se dejan secar al aire y se recoge el exceso de agua con un papel de filtro. El secado definitivo se realiza en estufa a 37 °C durante toda la noche.

9.- Los cortes ya secos y deshidratados, se introducen en tolueno, y después de un baño de unos 10 minutos se cubren con cubreobjetos con ENTELLÁN, se dejan secar y se observan con el microscopio de fluorescencia.

6.b.3.- Inmunodetección a microscopía electrónica

El protocolo seguido para inmunodetección con oro coloidal a microscopía electrónica es el siguiente.

Las ratas fueron perfundidas como anteriormente se detalló con glutaraldehído al 2 % y paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato 0.1 M y pH 7.4 a 4 °C durante 15 minutos. El cerebro fue diseccionado en bloques donde se situaba el núcleo supraóptico, postfijado en el mismo fijador a 4 °C durante toda la noche y seccionado en el vibratomo.

Los cortes de vibratomo fueron incluídos. Para ello los cortes fueron deshidratados en etanol utilizando concentraciones crecientes al tiempo que se reduce la temperatura a medida que aumenta la concentración del agente deshidratante:

- 1.- etanol 30° a 0 °C. Una hora
- 2.- etanol 50° a – 20 °C. Una hora
- 3.- etanol 70° a – 35 °C. Una hora
- 4.- etanol 96° a – 35 °C. Una hora
- 5.- etanol 100° a – 35 °C. Una hora

La infiltración se llevó a cabo con los siguientes baños.

- 1.- Lowicryl-Etanol (1:1 vol/vol) durante 60 min. a – 35 °C
- 2.- Lowicryl-Etanol (2:1 vol/vol) durante 60 min. a –35 °C
- 3.- Lowicryl durante 1 hora a – 35 °C
- 4.- Lowicryl durante toda la noche a – 35 °C

Las muestras se preparan y se orientan en cápsulas rellenas con Lowicryl de las que se elimina las burbujas de aire. La polimerización de resina se llevó a cabo por irradiación indirecta con luz ultravioleta durante 48 horas a –30 °C y posteriormente 24 horas a temperatura ambiente. Se obtuvieron secciones ultrafinas del núcleo supraóptico que fueron

recogidos con rejillas de níquel hexagonales recubiertas con una película de Formvar. Estas rejillas se emplearon para la realización de inmunodetecciones con oro coloidal cuyo protocolo se expone a continuación:

- 1.- Tratamiento de digestión enzimático. Es necesario para el caso de los anticuerpos para detectar los proteoglucanos condroitines 0, 4 y 6 sulfato y queratán sulfato. Incubación con condroitinasa ABC (*Proteus vulgaris*) de Sigma. Se usó a la concentración de 0.1 U/ml en tampón Tris-acetato de sodio 40 mM-40 mM y suero bobino (BSA) a 0'01 % en una estufa a 37 °C durante 1:30 horas en cámara húmeda.
- 2.- Baños en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.4 durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 3.- Incubación con la solución de bloqueo. Suero fetal bobino al 1 % y glicina 0.02 M en tampón fosfato 0.1 M y pH 7.4 durante 10 min. a temperatura ambiente.
- 4.- Incubación con el primer anticuerpo diluido en la solución bloqueante (suero fetal bobino al 1 % y glicina 0.02 M en tampón fosfato 0.1 M y pH 7.4) durante toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. Las diluciones de los anticuerpos fueron previamente detalladas.
- 5.- Lavados en una solución de tampón fosfato 0.1 M a pH 7.4 que contenía 0.02 M de glicina durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 6.- Incubación con el segundo anticuerpo. Inmunoglobulina G contra ratón hecho en cabra y conjugada con una partícula de oro coloidal de 10 nanómetros (CHEMICON). Diluido a 1:25 en suero fetal bovino al 1 % y glicina al 0.02 M en tampón fosfato 0.1 M y pH 7.4 durante 1:30 horas.
- 7.- Lavados en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.4 durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 8.- Lavados en agua bidestilada durante 10 min.
- 9.- Contraste con acetato de uranilo de 2 % durante 20 min.
- 10.- Lavados en agua bidestilada durante 3 min.
- 11.- Contraste con citrato de plomo de Reynolds durante 2 ó 3 min.
- 12.- Lavados en agua bidestilada durante 10 min.
- 13.- Secado de las rejillas para su posterior observación.

Este proceso termina con la observación de las rejillas en el microscopio electrónico Zeiss modelo 902. Su estudio proporcionará la realización de las microfotografías que se exponen más adelante en esta tesis.

RESULTADOS

I.- Observación en el crecimiento, adultos y vejez a microscopía óptica

1.- Distribución del hierro coloidal

Estadio P1:

En general, están bien marcados los dos núcleos, tanto el supraóptico, como el paraventricular. El marcaje es muy similar al neuropilo. El marcaje es muy fuerte en todo el tejido nervioso.

Estadio P7:

El núcleo supraóptico está bien marcado y el núcleo paraventricular lo está también. Su marcaje no excede al del neuropilo. El núcleo magnocelular preóptico están marcado pero sin resaltar del resto del neuropilo. Aparece marcaje perivascular en forma de lámina. El epéndimo es negativo. Se observan unas células positivas. Su citoplasma está cargado de marcaje en forma vesicular. Su tamaño coincide con células gliales (seguramente astrocitos) y se sitúan sobre sustancia blanca que se marca con poca fuerza con esta técnica en este estadio. Asimismo el quiasma óptico es positivo con igual marcaje que el neuropilo.

Estadio P14:

El núcleo supraóptico y núcleo paraventricular se encuentran marcados, pero sin sobresalir del marcaje general del neuropilo. El núcleo magnocelular preóptico se encuentra igual que en el estadio P7. Sigue apareciendo el marcaje pericelular vascular. El quiasma óptico es positivo. Mientras que el epéndimo continúa siendo negativo.

Estadío P21:

El núcleo supraóptico tiene tinción, pero sin embargo, es menor que en estadios anteriores. Se conserva fuerte la tinción en la zona de fibras del núcleo. El núcleo paraventricular tiene un marcaje menor que se sitúa alrededor de las neuronas. El marcaje detectado en el núcleo magnocelular preóptico no destaca del observado en el resto del neuropilo, que va siendo menor que en estadios anteriores. El quiasma óptico tiene menor marcaje que en el neuropilo. El marcaje perivascular se mantiene, así como el epéndimo negativo.

Estadío M1:

El núcleo supraóptico (figs. 1, a y b) está bien marcado que destaca sobre el neuropilo. Lo mismo ocurre con el núcleo paraventricular (figs. 2, a y 2). En el núcleo magnocelular preóptico se observa un leve incremento de marcaje. Se observa buen marcaje en la limitante interna de forma difusa, es decir, sin formar una lámina definida. También se puede observar marcaje perivascular. El epéndimo es negativo.

Estadío M3:

En general, disminuye el marcaje en el neuropilo progresivamente desde los primeros estadios hasta los más avanzados. Sin embargo, el marcaje en los núcleos supraóptico y paraventricular se mantienen en niveles más bajos que los postnatales. El núcleo magnocelular preóptico baja un poco el marcaje que se observaba en los primeros días postnatales, pero en el estadio de un mes denota buen marcaje que destaca del neuropilo. Y por el contrario se puede observar fuerte marcaje de la limitante interna del tercer ventrículo.

El quiasma óptico aparece bastante poco teñido. Los vasos sanguíneos conservan marcaje perivascular.

Estadíos A1 y A2:

Se observa una disminución generalizada de la tinción en el neuropilo, sin embargo conserva buen nivel de marcaje el núcleo supraóptico y paraventricular. Dichos núcleos tienen algo menos de marcaje que en el estadio anteriormente estudiado.

Tabla de resultados de la histoquímica del hierro coloidal

Fe coloidal	NSO	NPV	NMPO	Epéndimo	Lim Epénd	QO	Neuropilo
Estadio P1	++++	++++	++++	-	++++	++++	++++
Estadio P7	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++
Estad. P14	+++	+++	+++	-	+++	++	++
Estad. P21	+++	+++	++	-	+++	+	+
Estadio M1	+++	++	++	-	+++	+/-	+/-
Estadio M3	+++	++	++	-	++	+/-	-/+
Estadio A1	++	+	+	-	+	+/-	-/+
Estadio A2	++	+	+	-	+	+/-	-/+

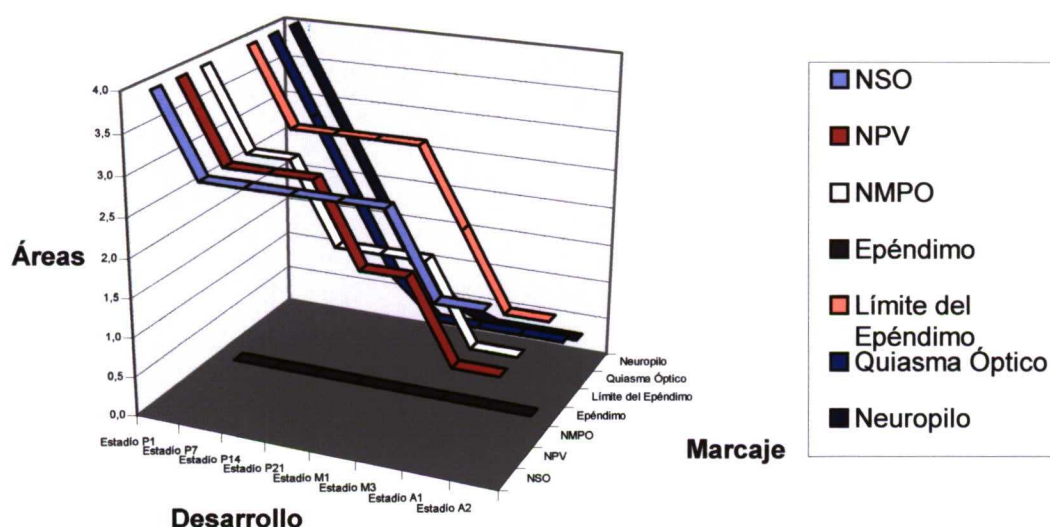
Leyenda de siglas:

- Fe coloidal: Hierro coloidal
- NSO: Núcleo supraóptico
- NPV: Núcleo paraventricular
- NMPO: Núcleo magnocelular preóptico
- Epéndimo: Ependimocitos
- Lim Epéndimo: Limitante interna ependimaria
- QO: Quiasma óptico
- Neuropilo: Matriz extracelular marcada donde no hay núcleos
- RP: Redes perineuronales clásicas

- Cort Pir: Corteza piriforme

Leyenda de signos:

- marcaje nulo
- /+ sin marcaje salvo en pequeñas zonas
- +/- marcaje positivo en su mayoría, con zonas negativas
- +
- ++ marcaje positivo intenso
- +++ marcaje positivo fuerte
- ++++ marcaje positivo muy fuerte

Hierro Coloidal

Histoquímica del hierro coloidal

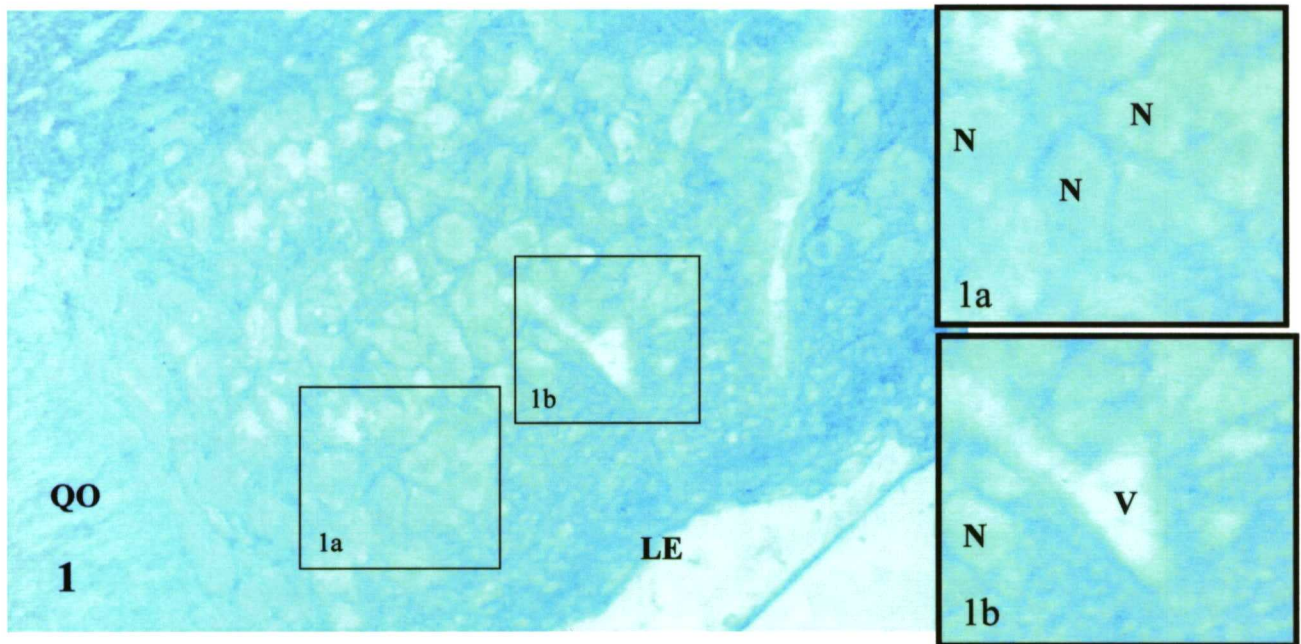


Figura 1. Imagen panorámica del núcleo supraóptico. En ella se puede observar la fuerte reacción alrededor de la superficie de las neuronas (N; figura 1a). También se observa fuerte tinción en la zona de las dendritas en la parte inferior del núcleo lindando con la limitante externa (LE), la cual está intensamente marcada. Otra zona muy teñida es el quiasma óptico (QO) en el que se insinúan los nodos de Ranvier y las zonas exteriores a la vaina de mielina. Los vasos sanguíneos (V) poseen asimismo buena tinción en la parte periférica del mismo (figura 1b). Estadío M1. Figura 1: 1.600; figura 1a: 3.200x; y figura 1b: 3.600x.

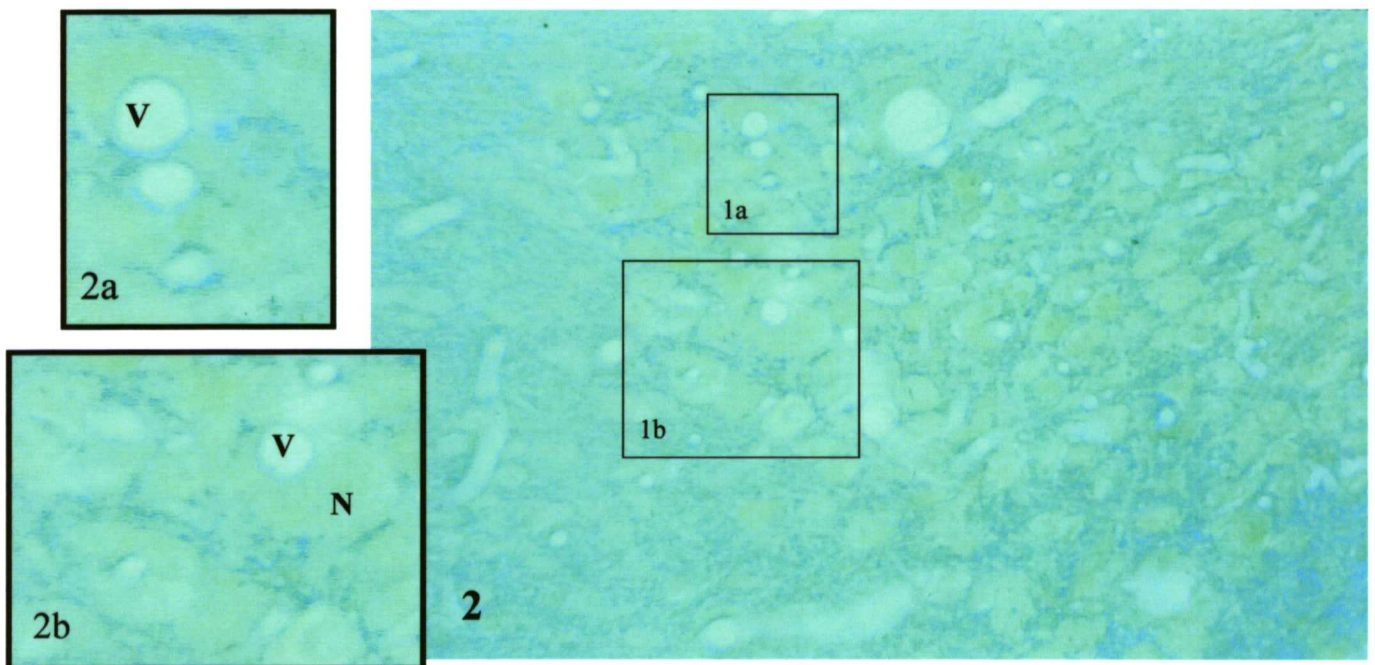


Figura 2. Panorámica del núcleo paraventricular. Los vasos, al igual que en el núcleo supraóptico, tienen buen marcaje en la zona de la periferia, constituyendo una lámina de tinción (figura 2a). En esta imagen también se puede apreciar el fuerte marcaje de matriz extracelular en la superficie de las neuronas (N; figura 2b). Se observa fuerte tinción en la matriz extracelular situada entre los somas neuronales. Estadío M1. Figura 2: 1.800x; figura 2a: 2.000x; y figura 2b: 4.200x.

2.- Distribución de la NADPH-diaforasa

La tinción que se observa en el hipotálamo con la histoquímica de la NADPH-diaforasa se corresponde con el marcaje que se obtiene con anticuerpos contra la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) (figs.10, 11 y 12). Por lo que se sigue en adelante toda la serie con la histoquímica.

Estadio P1:

El núcleo supraóptico aparece débilmente teñido al lado de un quiasma óptico bastante negativo a la tinción. El núcleo paraventricular está marcado más fuertemente. El núcleo magnocelular preóptico está escasamente marcado. El epéndimo no se tiñe.

Estadio P7:

El núcleo supraóptico (fig. 3) aparece poco marcado, el quiasma óptico sigue siendo negativo. El núcleo paraventricular (fig. 6) está intensamente marcado. El núcleo magnocelular preóptico (fig. 8 y 9) comienza a estar algo marcado. El epéndimo es negativo.

Estadio P14:

El marcaje posee la característica de ser intracelular completo o incompleto, menos la zona del núcleo celular que en la mayoría no se marca. El núcleo supraóptico aparece más teñido sobre todo en su parte dorsal. El núcleo paraventricular aparece bien marcado, se observa que se marca más la parte parvocelular que la magnocelular. El núcleo magnocelular preóptico se encuentra bien marcado. El quiasma óptico sigue permaneciendo con marcaje negativo. El epéndimo es negativo.

Estadío P21

La distribución de marcaje es similar al registrado para los adultos. El núcleo supraóptico (fig. 4) está bien marcado, ahora aunque predomina en su parte dorsal el marcaje también aparecen neuronas bien marcadas en otras zonas del núcleo. El núcleo paraventricular tiene una tinción bien definida sobre todo en su parte inferior. El núcleo magnocelular preóptico está bien marcado. El quiasma óptico es negativo pero aparecen marcados axones. A lo largo de la tinción de los axones se observan pequeños incrementos de marcaje que pueden coincidir con los nodos de Ranvier. El epéndimo es negativo.

Estadío M1

El núcleo supraóptico (fig. 5) se tiñe bastante, ya en toda su extensión, encontrando neuronas teñidas en varios tonos, unas muy teñidas y otras muy poco. El núcleo paraventricular (fig. 7) se tiñe en varios tonos, al igual que el supraóptico. El núcleo paraventricular se tiñe bien. En su parte inferior aparecen bien teñidas así como también en la parte magnocelular destacando algunas neuronas muy bien teñidas. El núcleo magnocelular preóptico aparece muy bien marcado. El quiasma óptico es negativo con la aparición de más cantidad de axones marcados, además de los nodos de Ranvier. El epéndimo es negativo.

Estadío M3

Similar al estadio M1 en su tipo de marcaje, respecto al lugar, distribución e intensidad.

Estadíos A1 y A2

En estos estadios se marcan los mismos núcleos que en el estadio M3 pero con menos intensidad de marcaje. Se tiñen menos los somas neuronales, pero aparecen más teñidas las prolongaciones que salen de éstos. En general se registra una disminución marcada de marcaje en ratas viejas.

En general, no existe marcaje en el neuropilo. Los núcleos hipotalámicos tienen un incremento de marcaje desde los primeros estadios hasta los tres meses de vida. A partir de esta edad, se observa una bajada en la tinción, que se mantendrá constante en el tiempo. Es interesante destacar la aparición de marcaje en el quiasma óptico a partir del día 21 postnatal. Y también cabe destacar la tinción negativa para el epéndimo, el límite del epéndimo.

Tabla de resultados de la histoquímica de la NADPH-diaforasa

NADPH-diaforasa	NSO	NPV	NMPO	Epéndimo	Lim Epénd	QO	Neuropilo
Estadio P1	+/-	+	+/-	-	-	-	-
Estadio P7	+/-	++	+/-	-	-	-	-
Estad. P14	+	+++	+	-	-	-	-
Estad. P21	+	+++	++	-	-	+	-
Estadio M1	++	+++	+++	-	-	++	-
Estadio M3	+++	+++	+++	-	-	++	-
Estadio A1	+	+	+	-	-	++	-
Estadio A2	+	+	+	-	-	++	-

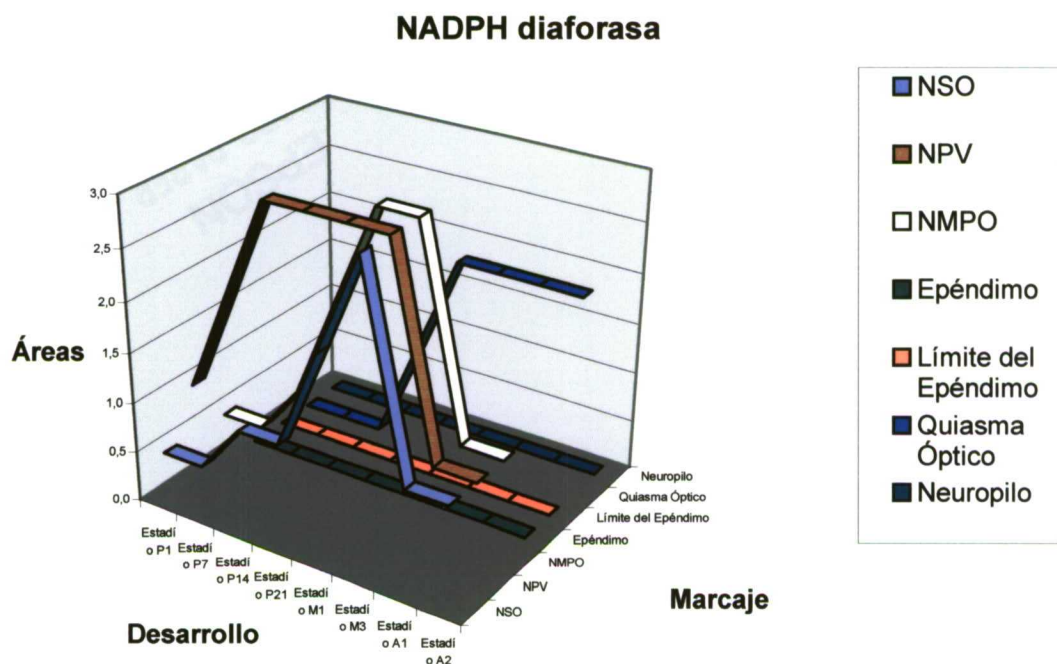
Leyenda de siglas:

- NADPG-d: NADPH-diaforasa
- NSO: Núcleo supraóptico
- NPV: Núcleo paraventricular
- NMPO: Núcleo magnocelular preóptico
- Epéndimo: Ependimocitos
- Lim Epéndimo: Limitante interna ependimaria
- QO: Quiasma óptico
- Neuropilo: Matriz extracelular marcada donde no hay núcleos
- RP: Redes perineuronales

- Cort Pir: Corteza piriforme

Leyenda de signos:

- marcaje nulo
- /+ sin marcaje salvo en pequeñas zonas
- +/- marcaje positivo en su mayoría, con zonas negativas
- +
- ++ marcaje positivo intenso
- +++ marcaje positivo fuerte
- ++++ marcaje positivo muy fuerte



Histoquímica de la NDAPH diaforasa

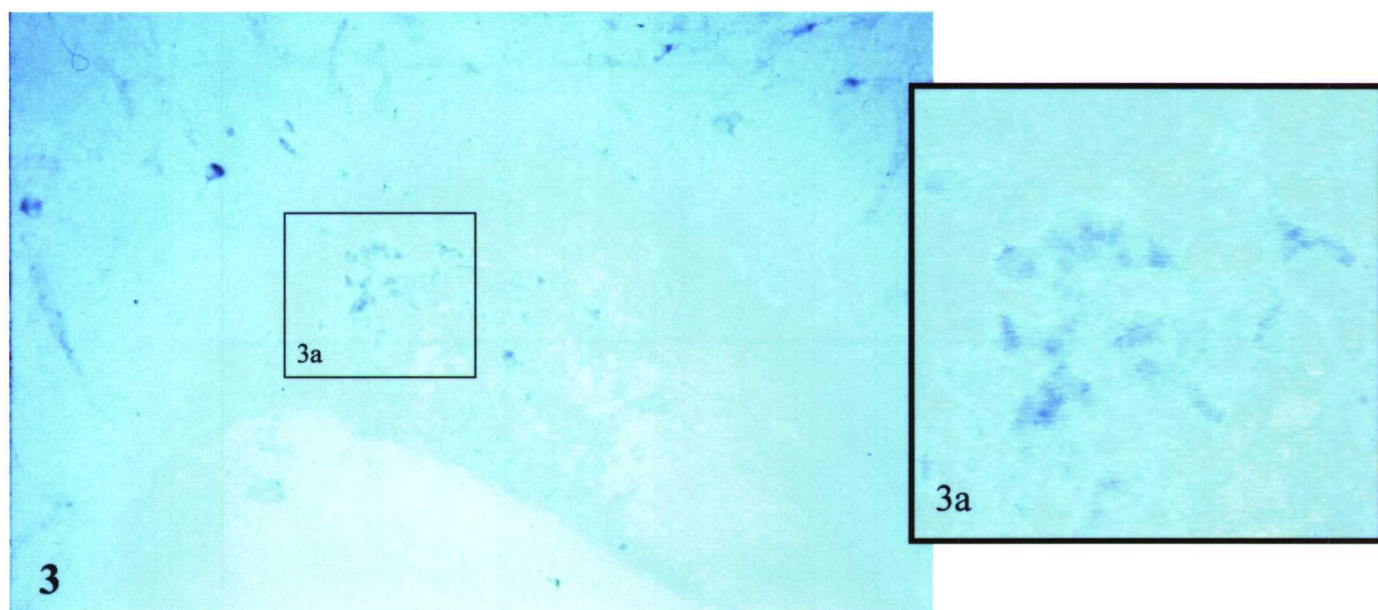


Figura 3. Panorámica del núcleo supraóptico. Comienza a observarse a estadios tan tempranos como P7 la tinción en las neuronas del núcleo (figura 3a). Estadío. P7. Figura 3: 1.500x; y figura 3a: 4.800x.

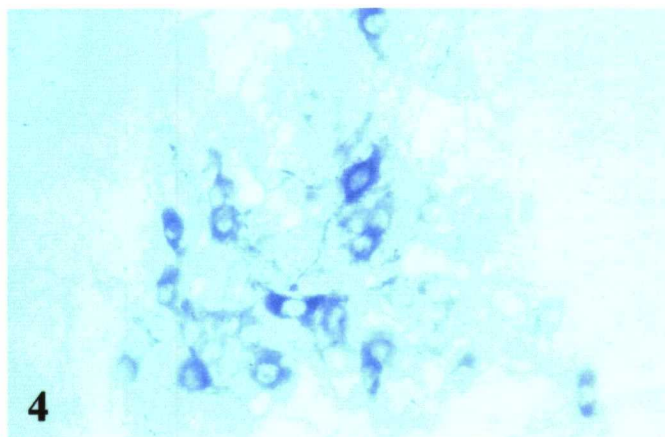
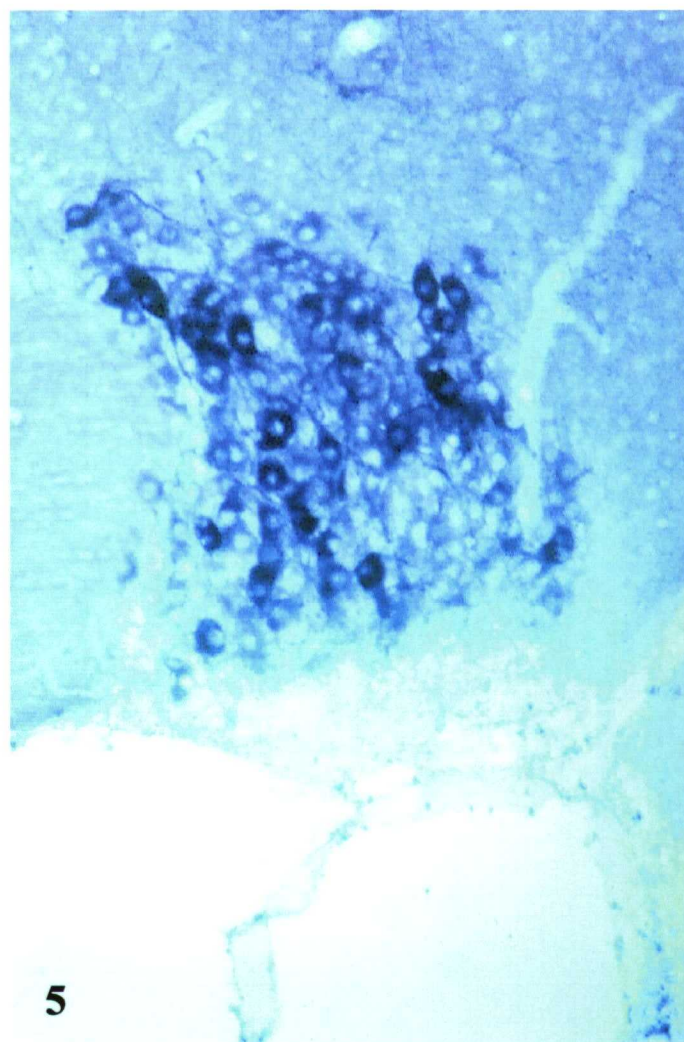


Figura 4. Panorámica del núcleo supraóptico. En este estadio es patente el incremento de la reacción. Se pueden observar con claridad la tinción sobre determinadas neuronas con actividad NADPH diaforasa mucho mayor que las células vecinas. Estadío P21. 1.600x.

Figura 5. Panorámica del núcleo supraóptico en el que aparecen neuronas mucho más teñidas que en el estadio anterior. Estadío M1. 1.300x.



Histoquímica de la NADPH diaforasa

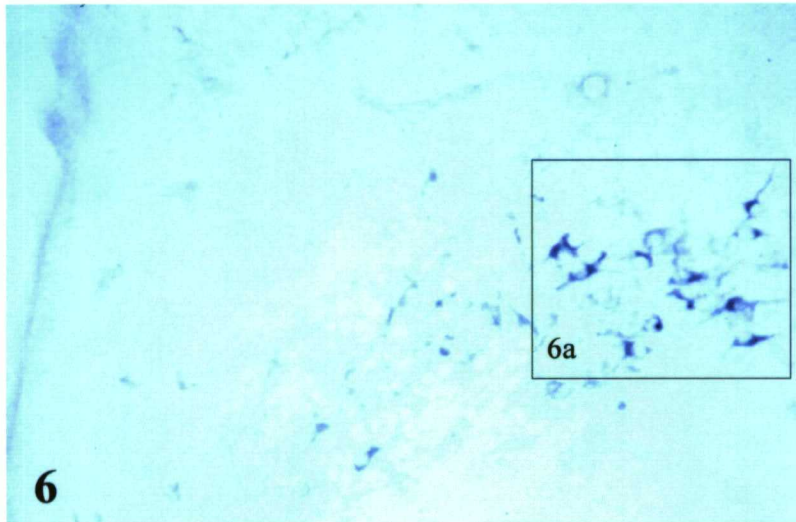


Figura 6. Panorámica del núcleo paraventricular. Las neuronas de este núcleo a tan temprana edad ya son capaces de teñirse con esta histoquímica. Y cabe destacar que las neuronas magnocelulares son las que más se tiñen, dejando a las neuronas parvocelulares

menos teñidas. También hay que notar que no todas las neuronas se tiñen, y las que se tiñen no lo hacen con igual tono. Estadío P7. Figura 6: 1.000x; y figura 6a: 1.500x.

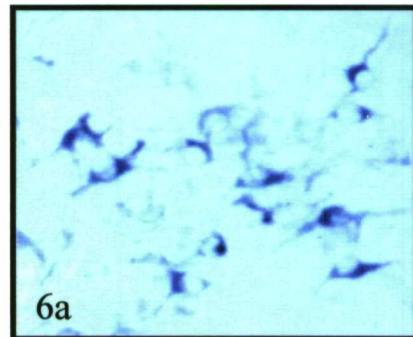


Figura 7. Panorámica del núcleo paraventricular. Se observa mayor tinción que en los estadíos anteriores, tiñéndose con fuerza algunas neuronas de este núcleo. Estadío M1. Figura 6: 750x; y figura 6a: 1.200x.

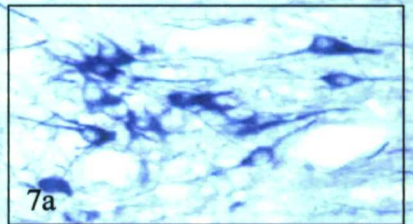
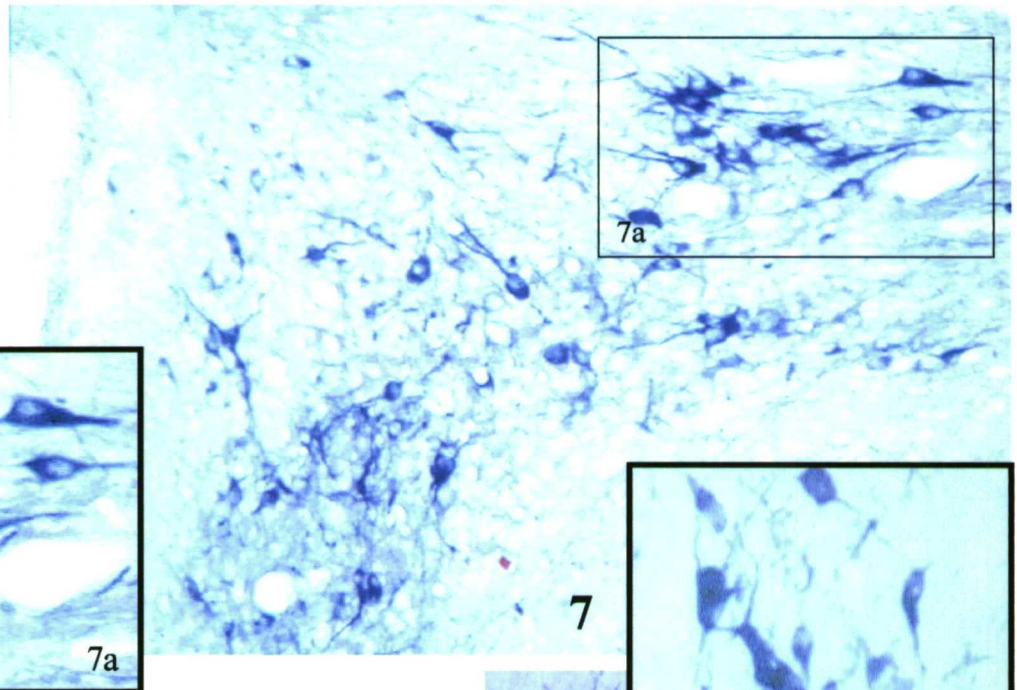


Figura 8. Panorámica del núcleo magnocelular preóptico. Estadío P7. Figura 8: 680x; y figura 8a: 1.000x.

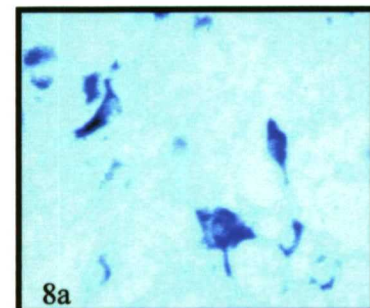
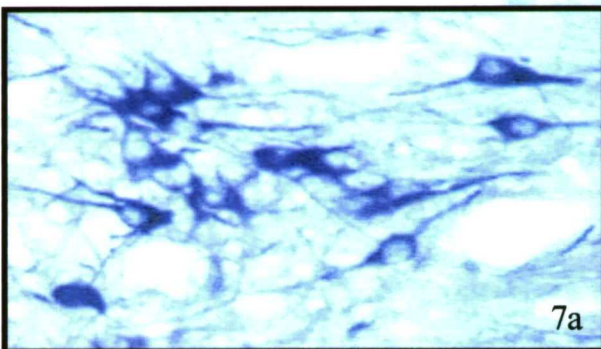
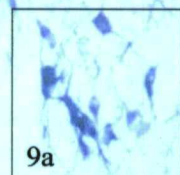
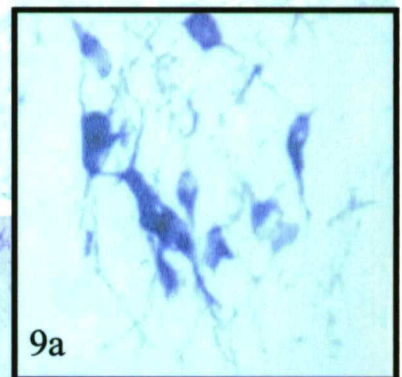
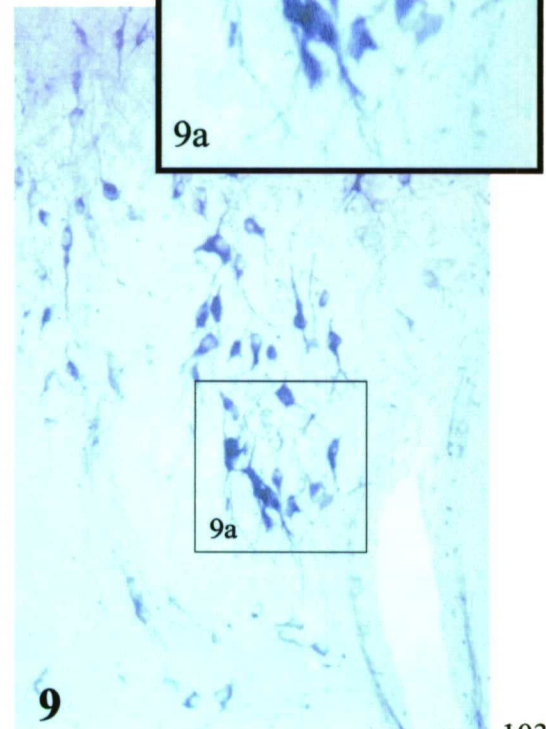
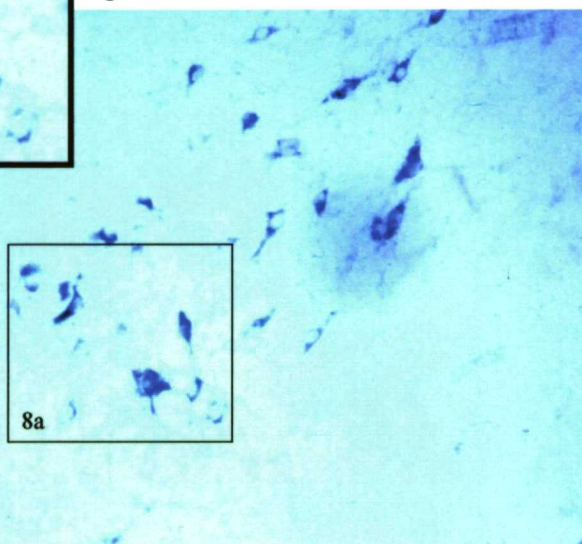


Figura 9. Panorámica del núcleo magnocelular preóptico, en donde aparecen neuronas muy teñidas con este método revelando su morfología magnocelular. Estadío P7. Figura 9: 1.200x; y figura 9a: 2.400x.



Immunodetección de la enzima óxido nítrico sintasa

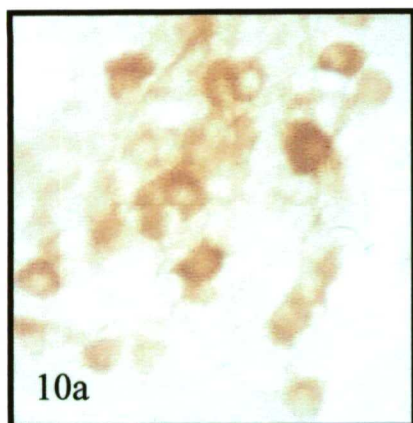
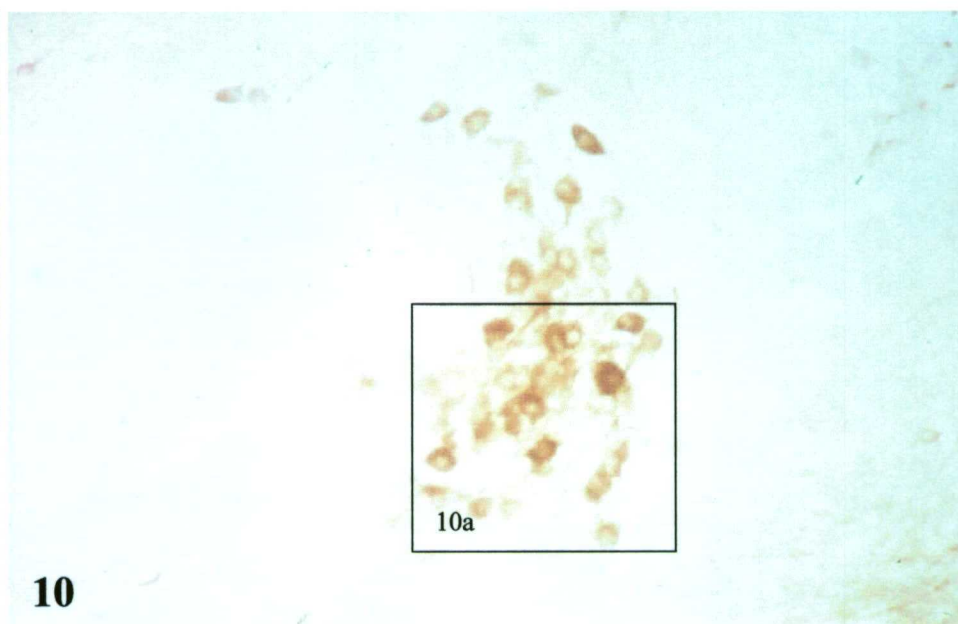


Figura 10. Panorámica del núcleo supraóptico en la que se puede observar, al igual que ocurría con la histoquímica de la NADPH diaforasa. Además se observan algunas neuronas teñidas frente a otras que lo están menos. Estadío M3. Figura 10: 700x; y figura 10a: 1.150x.



10

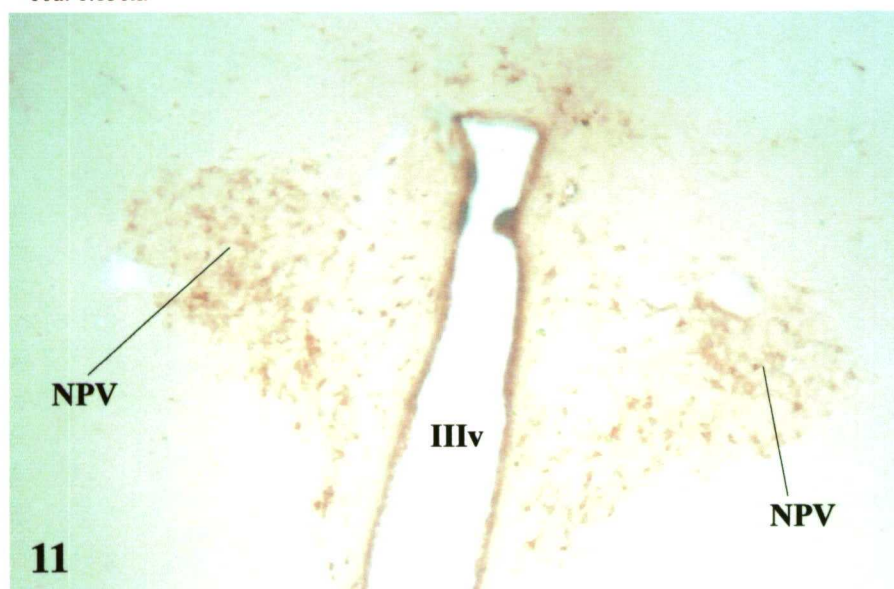
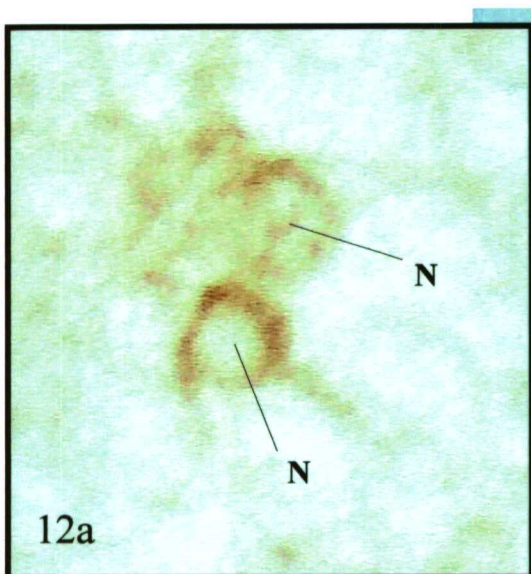


Figura 11. Panorámica de los dos núcleos paraventriculares (NPV) con el tercer ventrículo (IIIv). Se puede observar la inmunorreactividad de las neuronas de dicho núcleo, tiñéndose tanto las neuronas magnocelulares como las parvocelulares. También aparece reacción en las células del epéndimo. Estadío M3. 350x.



12

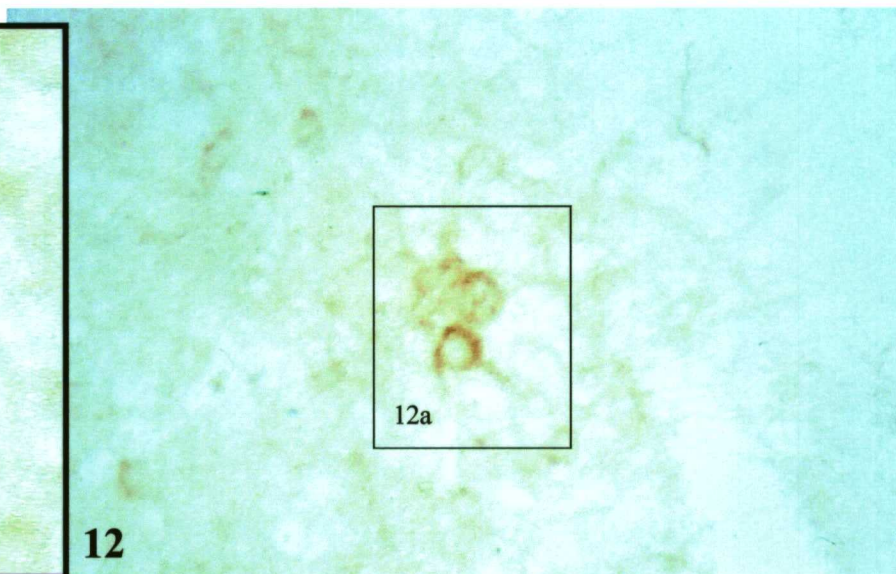


Figura 12. Imagen del núcleo magnoceleular preóptico en la que se puede observar inmunorreactividad en algunas neuronas de forma destacada en el núcleo (figura 12a). Estadío M3. Figura 12: 1.500x; y figura 12a: 3.600x.

3.- Distribución de la aglutinina de *Pisun sativum*

Estadio P1:

Estadio muy marcado. No destaca ningún núcleo sobre el marcaje en el neuropilo. El núcleo supraóptico (fig. 13) es positivo al igual que el núcleo paraventricular. El núcleo magnocelular preóptico no destaca del marcaje general. El quiasma óptico es positivo y también el epéndimo.

Estadio P7:

Marcaje similar a P1 disminuyendo algo el marcaje en el neuropilo. Aparece bien marcada la limitante interna que sigue al epéndimo.

Estadio P14:

Disminución de marcaje en el neuropilo. El núcleo supraóptico tiene igual intensidad de marcaje que el neuropilo al igual que el núcleo paraventricular (fig.15). El núcleo magnocelular preóptico no destaca del marcaje general del neuropilo. El quiasma óptico disminuye más su marcaje incluso que el neuropilo. Existe un marcaje en forma de lámina en la zona subependimaria formando una capa continua. También se observa marcaje perivascular. Se sigue marcando al igual que en el estadio anterior de P7 la limitante interna subependimaria. El epéndimo sigue siendo positivo.

Estadio P21:

El marcaje es similar al del estadio P14. Aparece un incremento de marcaje alrededor del tercer ventrículo.

Estadio M1:

El marcaje (fig. 14) es similar al del estadio P21, pero con la bajada mayor de intensidad respecto a los estadios anteriores.

Estadio M3:

El marcaje general disminuye. Sin embargo, aparece mayor marcaje en el núcleo supraóptico y paraventricular, donde se marcan algunas neuronas y con distinta intensidad. Asimismo también se pueden observar algunas prolongaciones.

Estadíos A1 y A2:

El marcaje del neuropilo disminuye. El núcleo supraóptico y núcleo paraventricular están más marcados y se hace patente un marcaje intracelular. Se sigue marcando la limitante interna subventricular y bajo el epéndimo. Así como también se marca la limitante externa, sobre todo en el núcleo supraóptico y sus proximidades. El quiasma óptico sigue siendo mucho más bajo el marcaje que el neuropilo. Se observa en su interior células marcadas en superficie, prolongaciones y estructuras que semejan nodos de Ranvier. El marcaje perivascular también se conserva. El epéndimo conserva la misma tinción que el neuropilo.

En general, el marcaje en el neuropilo y en el resto de áreas o núcleos decrece en marcaje. Este decrecimiento se observa limitado en el núcleo supraóptico y núcleo paraventricular que se mantiene constante a partir de los tres meses. Cabe destacar el marcaje también constante como los anteriores núcleos del límite del epéndimo.

Tabla de resultados con la aglutinina de *Pisun sativum*

PSA	NSO	NPV	NMPO	Epéndimo	Lim Epénd	QO	Neuropilo
Estadio P1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Estadio P7	++	++	++	++	++	++	++
Estad. P14	+	+	+	+	+	+	+
Estad. P21	+	+	+	+	+	+	+
Estadio M1	+	+	+	+	+	+	+
Estadio M3	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-
Estadio A1	+	+	-/+	-/+	+	-/+	-/+
Estadio A2	+	+	-/+	-/+	+	-/+	-/+

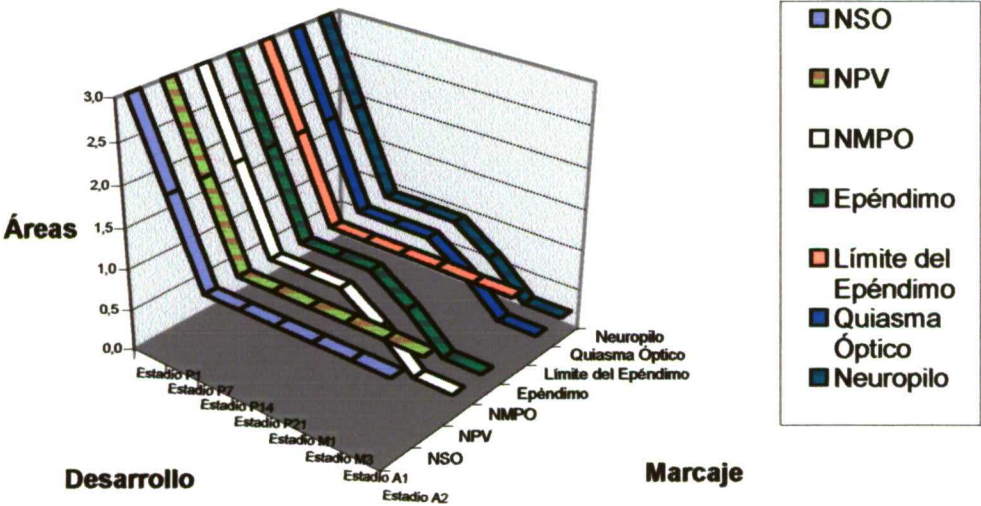
Leyenda de siglas:

- PSA: Aglutinina de *Pisun sativum*
- NSO: Núcleo supraóptico
- NPV: Núcleo paraventricular
- NMPO: Núcleo magnocelular preóptico
- Epéndimo: Ependimocitos
- Lim Epéndimo: Limitante interna ependimaria
- QO: Quiasma óptico
- Neuropilo: Matriz extracelular marcada donde no hay núcleos
- RP: Redes perineuronales

Leyenda de signos:

- marcate nulo
- /+ sin marcate salvo en pequeñas zonas
- +/- marcate positivo en su mayoría, con zonas negativas
- +
- ++ marcate positivo intenso
- +++ marcate positivo fuerte
- ++++ marcate positivo muy fuerte

Aglutinina de *Pisun sativum*



Histoquímica de la aglutinina de *Pisun sativum*

Figura 13. Vista del núcleo supraóptico. Se observa la fuerte reacción que se da en los primeros estadios. Estadío P1. Figura 13: 1.200x; y figura 13a: 2.400x.

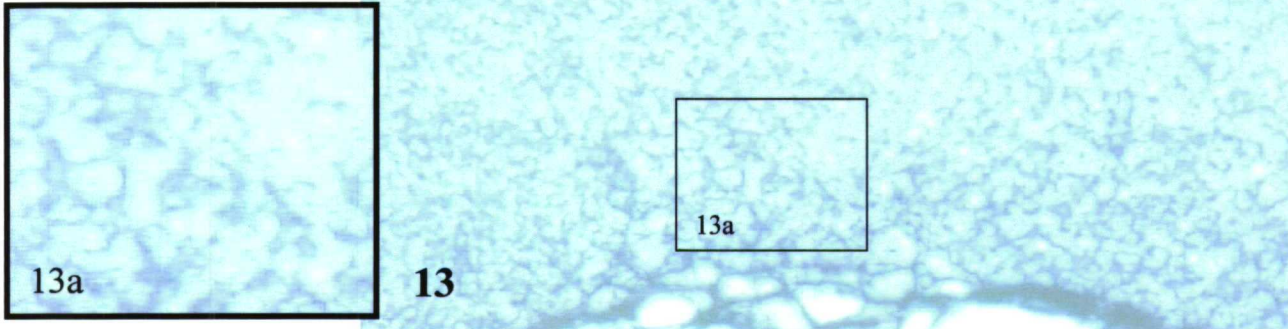


Figura 14. Panorámica del núcleo supraóptico en el que se observa la fuerte reactividad de todo el núcleo que contrapunta con el escaso marcaje del quiasma óptico (QO). Estadío M1. Figura 14: 660x; y figura 14a: 4.200x.

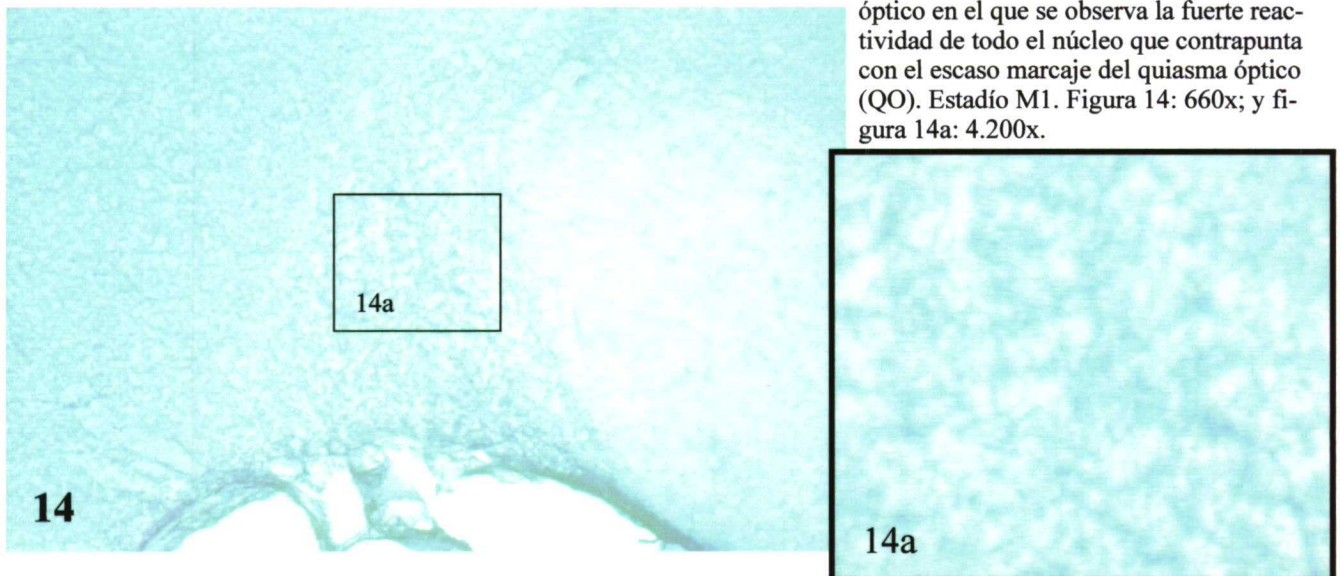
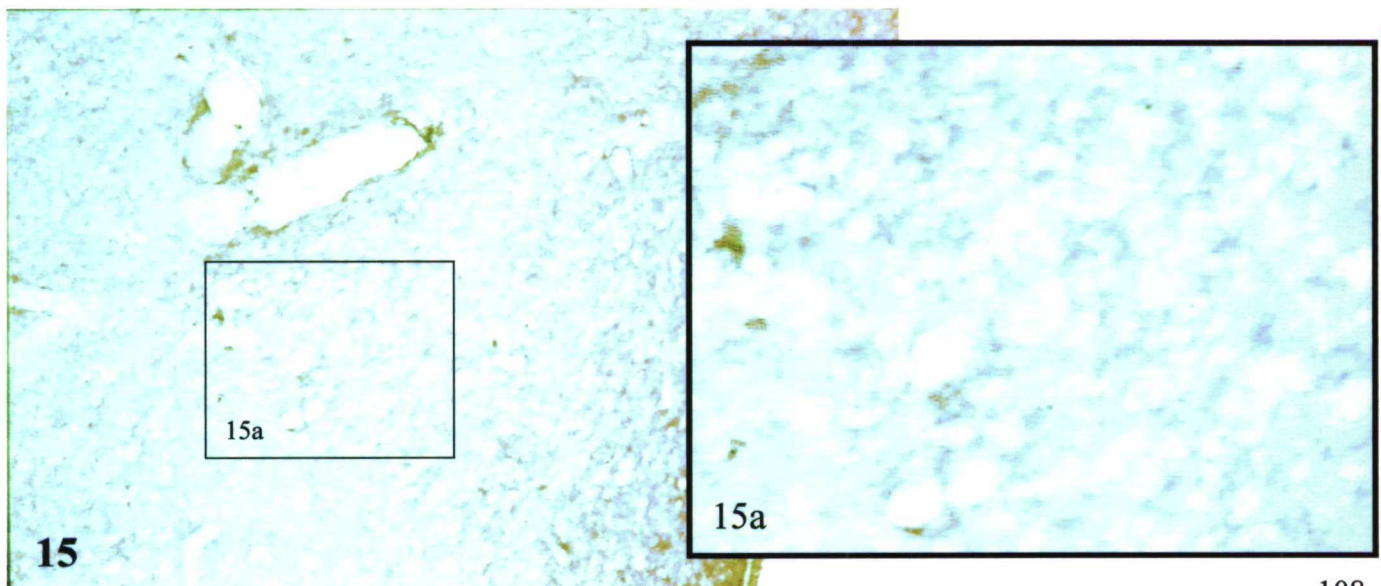


Figura 15. Panorámica del núcleo paraventricular. Se observa gran cantidad de marcaje que se puede detectar con esta histoquímica. Las neuronas están totalmente rodeadas de marcaje, si bien se aprecia que en algunas zonas está más patente el marcaje que en otras. Estadío P14. Figura 15: 800x; y figura 15a: 2.000x..



4.- Distribución de la aglutinina de la *Wisteria floribunda*

Estadio P1:

El marcaje generalizado caracteriza este estadio destacando únicamente con un marcaje mayor al neuropilo destaca el marcaje negativo del núcleo supraóptico y del núcleo paraventricular frente al intenso que se observa en el neuropilo.

Estadio P7:

El fuerte marcaje del neuropilo comienza a descender, pero sigue destacando en algunas áreas. El marcaje en los núcleos magnocelulares sigue igual que en el estadio P1.

Estadio P14:

Se mantienen los marcajes descritos anteriormente. La más interna muestra las primeras redes perineuronales todavía algo difusas en corteza cerebral.

Estadio P21:

En corteza cerebral, tomada como control positivo, aparecen las típicas redes perineuronales. Se puede observar marcaje en la zona superior e inferior del núcleo paraventricular (fig. 16). Sin embargo, no es positiva la matriz extracelular en el interior del núcleo, entre las células. Aparecen por primera vez redes perineuronales en el núcleo magnocelular preóptico con un marcaje débil (figs.17 y 18). En este estadio aparece de forma muy marcada y destaca con gran evidencia el núcleo reticular talámico (fig. 23), que mantendrá un marcaje muy fuerte desde este momento y durante toda la vida del animal.

Estadío M1:

En corteza las redes perineuronales están mejor definidas a la vez que baja el marcaje de la matriz extracelular. Existe igual marcaje en el resto de zonas que P21 pero con mayor intensidad. Tanto en el núcleo supraóptico (fig. 24) como en el núcleo paraventricular (fig. 25) aparece bien definido un marcaje de redes perineuronales de tipo difuso, con algunas zonas en la superficie de los somas neuronales con acúmulos de matriz extracelular dando mayor inmunorreactividad. Pero el marcaje no aparece directamente sobre la superficie de la neurona formando una lámina, sino más bien tiene un aspecto granuloso. También se puede observar un pequeño incremento de marcaje en la parte interna y basal del tercer ventrículo (fig. 25, IIIv) al lado del núcleo paraventricular.

Estadío M3:

Las redes perineuronales están muy bien definidas en el núcleo magnocelular preóptico y persiste el marcaje de matriz extracelular (figs. 19 y 27) que se detectaba en estadios anteriores. El marcaje alrededor del núcleo paraventricular se mantiene. El núcleo supraóptico es negativo, no apareciendo ningún marcaje.

Estadío A1:

Como comparación con el control positivo, en corteza las redes perineuronales están más marcadas. Disminuye el marcaje del neuropilo de matriz extracelular hipotalámica y se conserva el de las redes perineuronales en las zonas donde aparecen dando una sensación falsa de incremento de marcaje. En el núcleo magnocelular preóptico se observa un marcaje muy definido de redes perineuronales de tipo clásico

(fig.21). También se puede apreciar un marcaje de tipo puntual en el vecino quiasma óptico (fig. 22), donde se puede observar acúmulos de marcaje de matriz extracelular que coinciden con los nodos de Ranvier.

Estadio A2:

El marcaje que aparece es igual que en el estadio A1, pero más acusada la definición del marcaje. Prueba de ello es el marcaje tan fino y definido que aparece en el núcleo magnocelular preóptico (fig. 26), con redes perineuronales de tipo clásico. Se acumula el marcaje en la superficie de la célula sin formar una lámina propiamente dicha pues tiene pequeñas discontinuidades en el marcaje y zonas de mayor incremento (figs. 26 a y b). Se observa una pérdida de marcaje en los núcleos con respecto a estadios iniciales. Ello se detecta tanto en estructuras como redes perineuronales de tipo clásico como en las de tipo difuso.

En general, el marcaje en todas las áreas disminuye con la vida del animal. Solamente en determinadas zonas la tinción se mantiene en intensidad y va cambiando de forma. Se define el marcaje hasta tomar el aspecto de redes perineuronales en forma de red de tipo clásico, tal y como ocurre en el núcleo magnocelular preóptico. Llama la atención la inmunorreactividad totalmente negativa del núcleo supraóptico y paraventricular, a lo largo de la vida del animal. También existen otras áreas que permanecen totalmente negativas como el epéndimo y el límite endimario. Hay que destacar que el quiasma óptico que en principio es negativo, después alrededor de los 21 días es ligeramente positivo marcándose los nodos de Ranvier, en lo sucesivo de manera constante.



Tabla de resultados con la aglutinina de la *Wisteria floribunda*

WFA	NSO	NPV	NMPO	Epéndimo	Lim Epénd	QO	Neuropilo
Estadio P1	-	-	+++	-	-	-	+++
Estadio P7	-	-	++	-	-	-	++
Estad. P14	-	-	+	-	-	-	+
Estad. P21	-	-	+ RP _C	-	-	-/+	+/-
Estadio M1	-	-	+ RP _C	-	-	-/+	-/+
Estadio M3	-	-	+ RP _C	-	-	-/+	-/+
Estadio A1	-	-	+ RP _C	-	-	-/+	-
Estadio A2	-	-	+ RP _C	-	-	-/+	-

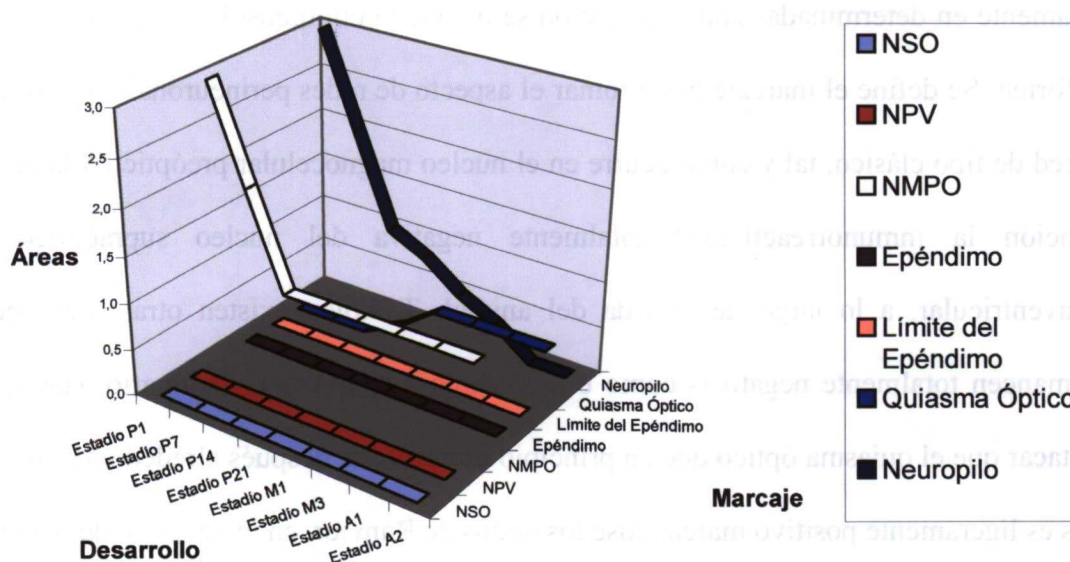
Leyenda de siglas:

- WFA: Aglutinina de la *Wisteria floribunda*
- NSO: Núcleo supraóptico
- NPV: Núcleo paraventricular
- NMPO: Núcleo magnocelular preóptico
- NRT: Núcleo reticular talámico
- Epéndimo: Ependimocitos
- Lim Epéndimo: Limitante interna ependimaria
- QO: Quiasma óptico
- Neuropilo: Matriz extracelular marcada donde no hay núcleos

- Cort Pir: Corteza Piriforme
- RP_C: Redes perineuronales clásicas en forma de red

Leyenda de signos:

- marcaje nulo
- /+ sin marcaje salvo en pequeñas zonas
- +/- marcaje positivo en su mayoría, con zonas negativas
- + marcaje positivo
- ++ marcaje positivo intenso
- +++ marcaje positivo fuerte
- ++++ marcaje positivo muy fuerte

Gráfico de la aglutinina de *Wisteria floribunda*

Histoquímica de la aglutinina de la *Wisteria floribunda*

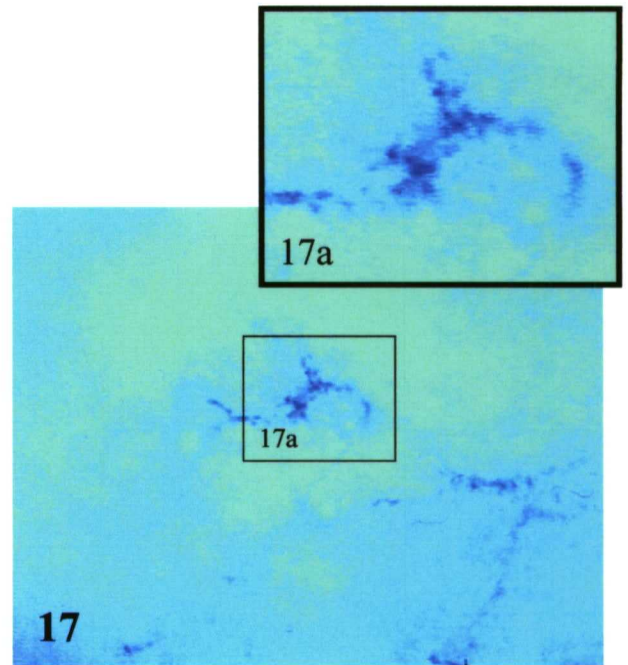
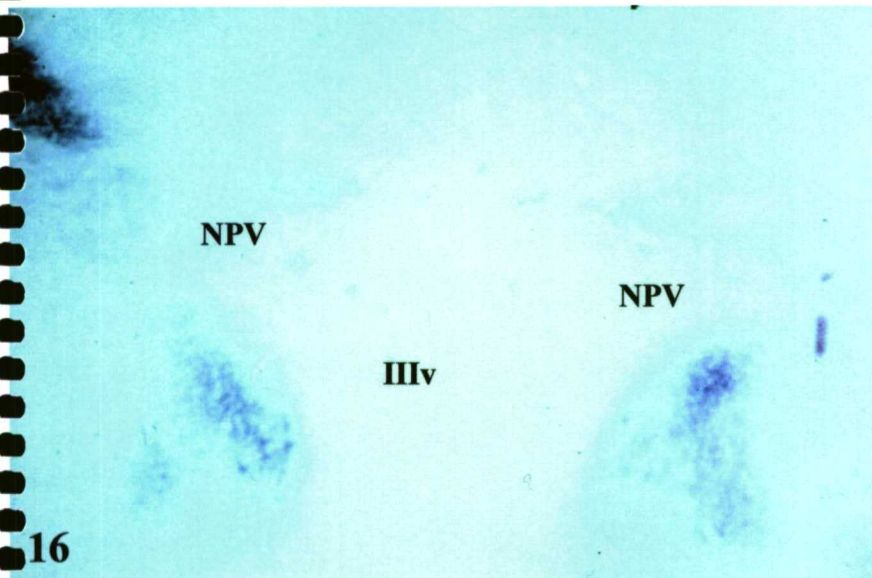
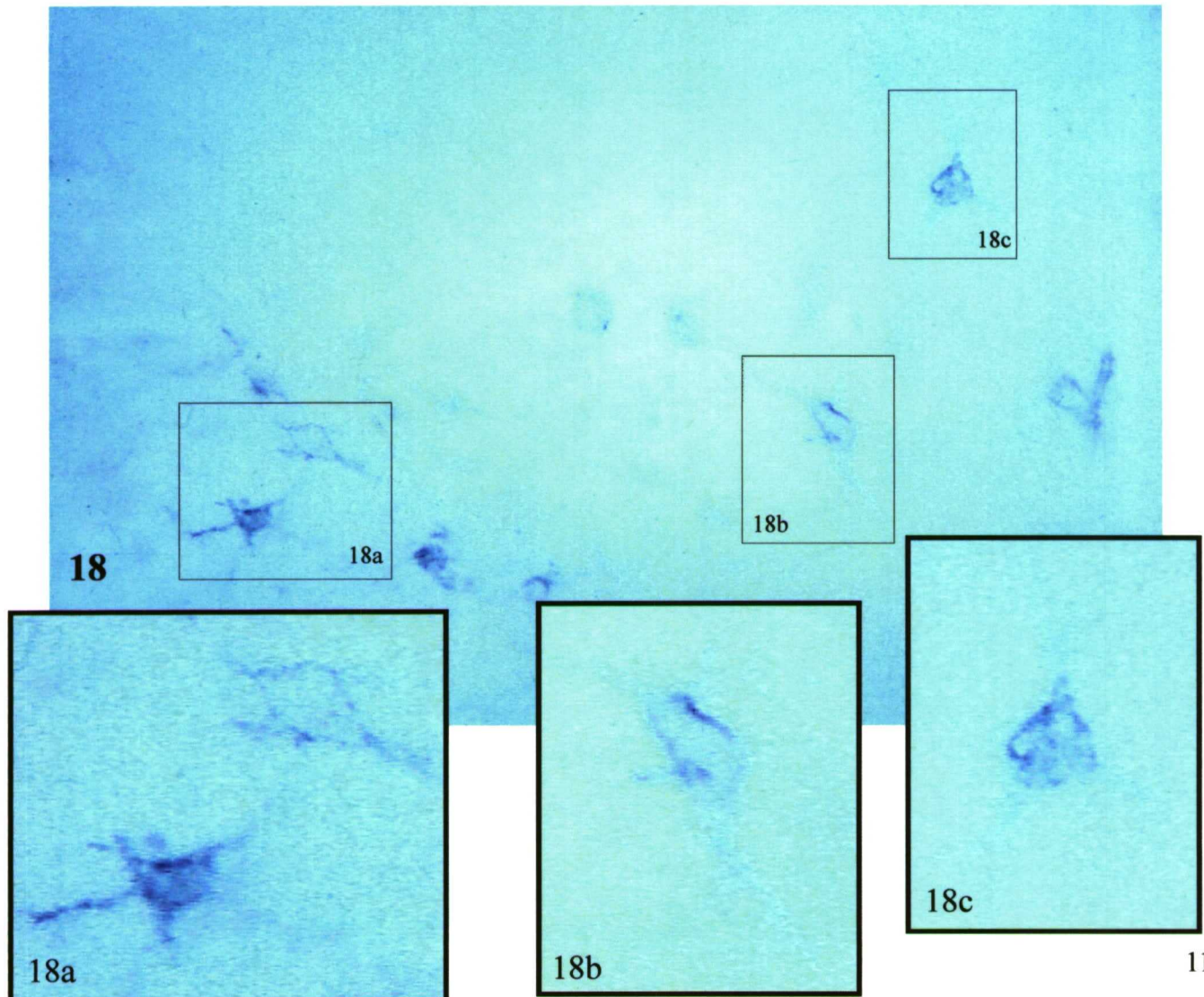


Figura 16. Panorámica de ambos núcleos paraventriculares (NPV). Se observa fuerte marcaje en el límite inferior de dichos núcleos. También se observa reactividad en la zona superior del mismo. Así como en la zona lateral que es la llegada del núcleo reticular talámico. El núcleo paraventricular es negativo. Estadío P21. 180x.

Figura 17. Detalle del núcleo magnocelular preóptico. La neurona, fuertemente teñida, presenta redes perineuronales de tipo clásico, así como polarización en su marcaje. Estadío P21. Figura 17: 1.600x; y figura 17a: 4.400x.

Figura 18. Panorámica del núcleo magnocelular preóptico con tres detalles de neuronas con redes perineuronales de tipo clásico. Estadío P21. Figura 18: 1.800x; figura 18a: 5.400x; figura 18b: 3.600x; y figura 18c: 3.900x.



Histoquímica de la aglutinina de la *Wisteria floribunda*

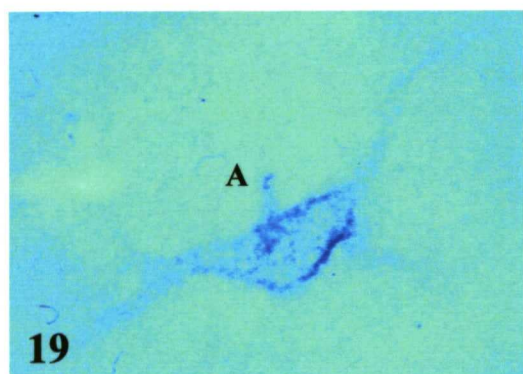


Figura 19. Detalle de neurona del núcleo magnocelular preóptico. Se puede observar la marcada polaridad del marcaje, así como un aumento del marcaje en el segmento proximal del axón (A). Estadío M3. 2.000x.



20

Figura 20. Panorámica del núcleo supraóptico. Se observa la falta de tinción en dicho núcleo, pero con fuerte marcaje en corteza piriforme adyacente. Estadío A1. 4.000x.

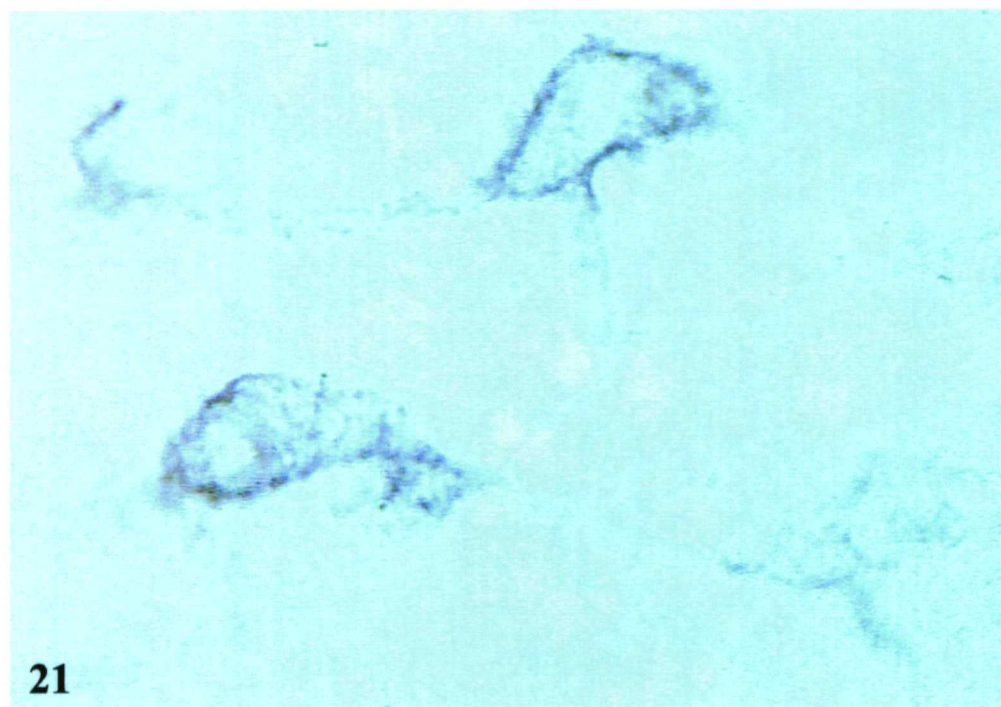
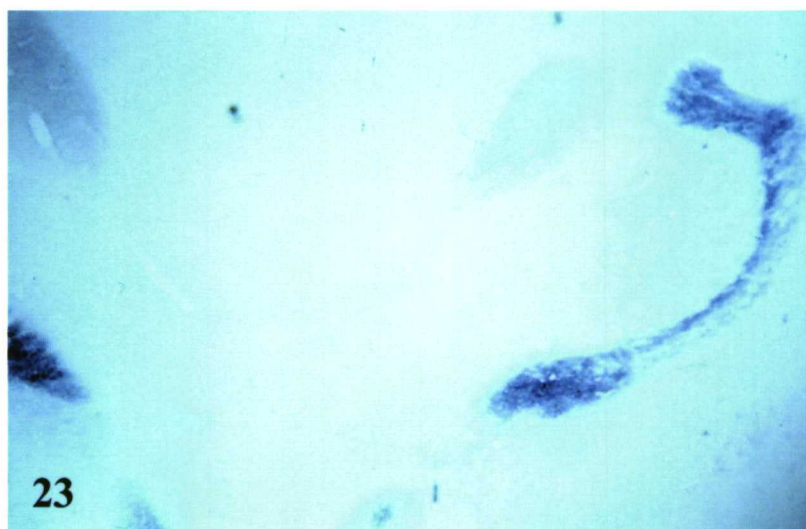
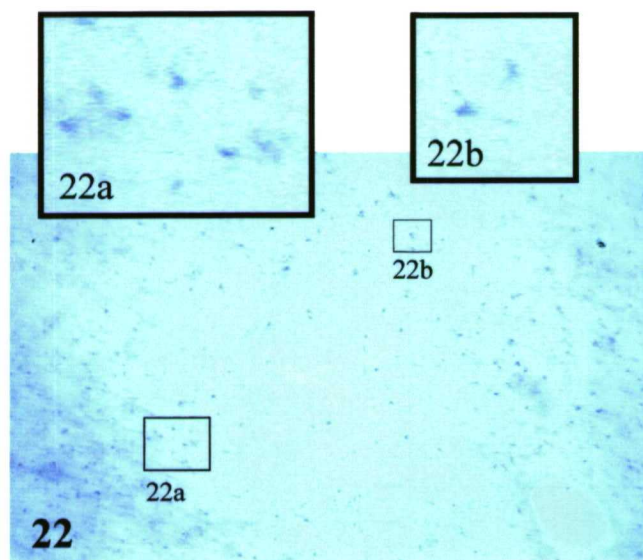


Figura 21. Detalle de dos neuronas del núcleo magnocelular preóptico que poseen el marcaje típico de las redes perineuronales de tipo clásico. Estadío A1. 4.000x.

Figura 22. Detalle del marcaje obtenido en el quiasma óptico. Se puede observar marcaje entre las fibras y acúmulos de marcaje en los nodos de Ranvier (detalles). Estadío A1. Figura 22: 930x; figura 22a: 4.650x; y figura 22b: 6.500x.

Figura 23. Panorámica del fuerte marcaje obtenido en el núcleo reticular talámico. Estadío P21 100x..



5.- Distribución y localización del proteoglucano condroitín 0-sulfato**Estadio P1:**

Se observa un fuerte marcaje de matriz extracelular en el neuropilo hipotalámico. El núcleo supraóptico está marcado y se rodea en su zona dorsal y lateral de menor marcaje, delimitando el núcleo. En el núcleo paraventricular (fig.28), bien marcado, aparece un halo de fuerte marcaje que delimita el núcleo (fig. 28b) lo mismo que con el núcleo reticular talámico (fig. 28a), en la parte magnocelular disminuye el marcaje de las células. En núcleo magnocelular preóptico no se distingue, es decir, no se diferencia del marcaje del neuropilo. El epéndimo es negativo. Por último el quiasma óptico es negativo.

Estadio P7:

El núcleo supraóptico sigue marcado, desaparece la delimitación del núcleo por menor marcaje, ya no se delimita. El núcleo paraventricular está marcado, el aumento de marcaje que experimentaba en P1 en su límite decrece en intensidad hasta el punto de que pierde la característica limitante. El núcleo magnocelular preóptico, no se distingue su marcaje que se confunde con el del neuropilo. El epéndimo sigue siendo negativo, aunque comienza a detectarse un marcaje difuso en la zona de la limitante interna.

Estadio P14:

Se observa un descenso generalizado de marcaje en la matriz extracelular del hipotálamo. El núcleo supraóptico es positivo. El marcaje se mantiene. El núcleo está más marcado que el neuropilo que lo rodea. El núcleo paraventricular es positivo. Está

más marcado que el resto del neuropilo que lo rodea. Desaparece el marcaje limítrofe del núcleo. En el núcleo magnocelular preóptico no se distingue marcaje. El quiasma óptico (fig.30) tiene una fuerte bajada de marcaje diferenciándose los nodos de Ranvier (fig. 30a). Aparece como nuevo el marcaje de la base del epéndimo, quedando estas células negativas para el marcaje.

Estadio P21:

Sigue descendiendo el marcaje en toda la matriz extracelular del hipotálamo. El núcleo supraóptico es positivo. El marcaje permanece igual que en P14. El núcleo paraventricular es positivo y se mantiene como en el estadio P14. El núcleo magnocelular preóptico aparece marcando por primera vez con un marcaje de alta intensidad en la superficie de algunas neuronas del núcleo, constituyendo unas redes perineuronales difusas. El quiasma óptico en la zona central posee marcaje positivo en los nodos de Ranvier, pero en los extremos cercanos al núcleo supraóptico es negativo. El ependimocito es negativo, notando un incremento de marcaje en la limitante interna.

Estadio M1:

Aumenta el descenso de marcaje de la matriz extracelular del hipotálamo. El núcleo supraóptico es positivo al igual que en el núcleo paraventricular. El marcaje, menos difuso, aparece en los dos núcleos menos difuso entre prolongaciones más definidas por el marcaje. El núcleo magnocelular preóptico aparece bien marcado definiéndose las redes perineuronales en el soma neuronal, pero no aparece en las prolongaciones de las neuronas. En algunas zonas sobre todo más mediales se puede observar en el quiasma óptico marcaje. La zona que aparece marcada en el quiasma

óptico corresponde a los nodos de Ranvier. El epéndimo sigue negativo y permanece la limitante teñida.

Estadio M3:

La bajada de marcaje en el neuropilo del hipotálamo hace que éste sea prácticamente nulo. El núcleo supraóptico destaca en su marcaje sobre el neuropilo que tiene continuidad con la capa molecular de la corteza piriforme. Continúa existiendo una banda de mayor marcaje en la zona limitante externa del núcleo supraóptico. El núcleo paraventricular aparece débilmente marcado en su conjunto. Aunque destaca sobre el neuropilo que lo rodea. Dentro del núcleo paraventricular la zona más marcada la constituye el área de las neuronas magnocelulares. El núcleo magnocelular preóptico, además, presenta redes perineuronales bien delimitadas que se extienden por las prolongaciones, no sólo en el soma, como en el estadio M1. Presentándose las redes con toda nitidez. El quiasma óptico se presenta negativo en los extremos y positivo en la parte medial. También se observa fuerte reactividad del núcleo reticular talámico (fig. 29) a este marcaje.

Estadio A1:

El núcleo supraóptico es positivo con iguales características que en el estadio M3. El núcleo paraventricular es igual que para M3, pero destacando el mayor marcaje en las neuronas magnocelulares. En el núcleo magnocelular, las redes perineuronales están muy marcadas y perfectamente definidas, no sólo en el soma, sino también en las prolongaciones. El quiasma óptico igual que en M3. El epéndimo sigue siendo negativo en sus células y positivo en la limitante.

Estadio A2:

Tanto el núcleo supraóptico como paraventricular como magnocelular preóptico, son similares al visto en el estadio A1. Y el quiasma óptico y epéndimo permanecen igual que en el estadio A1.

En general, el marcaje detectado en el neuropilo decrece con el avance de la edad del animal. Sin embargo en el núcleo supraóptico y paraventricular el marcaje se mantiene constante desde el estadio P7. El fuerte marcaje detectado en el núcleo magnocelular preóptico decrece con el tiempo hasta llegar a P21 donde empieza a definirse el marcaje difuso apareciendo con el tiempo redes perineuronales de tipo clásico en forma de red, que se mantendrán durante toda la vida del animal. Llama la atención el marcaje de los nodos de Ranvier que aparece en el quiasma óptico de manera constante a partir del día P21. Destaca el marcaje negativo de los endimocitos pero también el positivo del límite endimario a partir del día P14.

Tabla de resultados con anticuerpos contra condroitín 0-sulfato proteoglucano

C0SPG	NSO	NPV	NMPO	Epéndimo	Lim Epénd	QO	Neuropilo
Estadio P1	++	++	++++	-	-	++	++++
Estadio P7	+	+	+++	-	-	++	+++
Estad. P14	+	+	++	-	+	+	++
Estad. P21	+	+	+ R _{PC}	-	+	+/-	++
Estadio M1	+	+	+ R _{PC}	-	+	-/+	+
Estadio M3	+	+	+ R _{PC}	-	+	-/+	-
Estadio A1	+	+	+ R _{PC}	-	+	-/+	-
Estadio A2	+	+	+ R _{PC}	-	+	-/+	-

Leyenda de siglas:

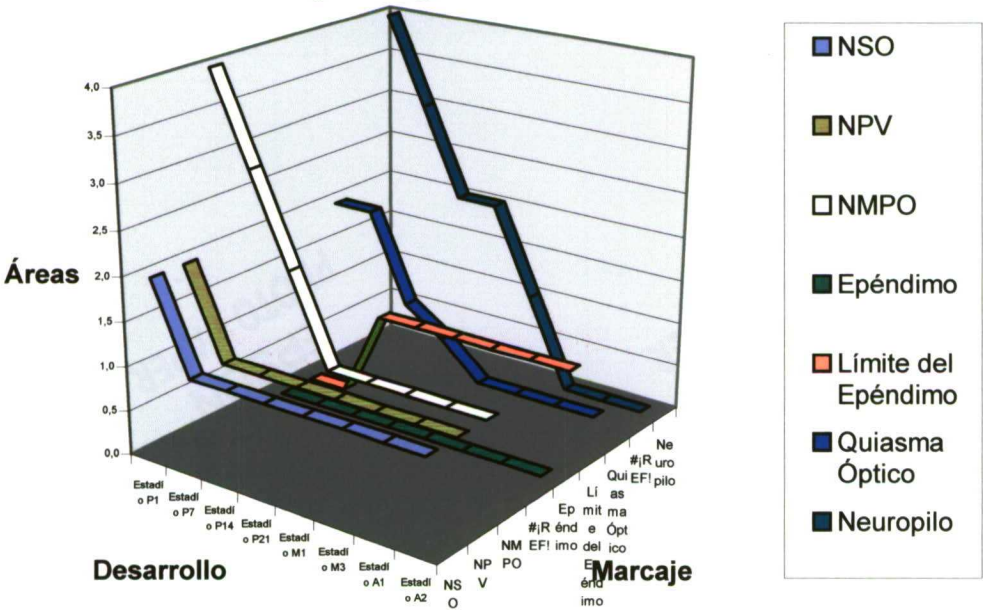
- C0SPG: Condroitín 0-sulfato proteoglucano
- NSO: Núcleo supraóptico
- NPV: Núcleo paraventricular
- NMPO: Núcleo magnocelular preóptico
- Epéndimo: Ependimocitos
- Lim Epéndimo: Limitante interna ependimaria
- QO: Quiasma óptico
- Neuropilo: Matriz extracelular marcada donde no hay núcleos

- R_{PC}: Redes perineuronales clásicas, con aspecto de red

Leyenda de signos:

- marcaje nulo
- /+ sin marcaje salvo en pequeñas zonas
- +/- marcaje positivo en su mayoría, con zonas negativas
- + marcaje positivo
- ++ marcaje positivo intenso
- +++ marcaje positivo fuerte
- ++++ marcaje positivo muy fuerte

Gráfico del proteoglucano condroitín 0-sulfato



Inmunodetección de condroitín 0-sulfato proteoglucano

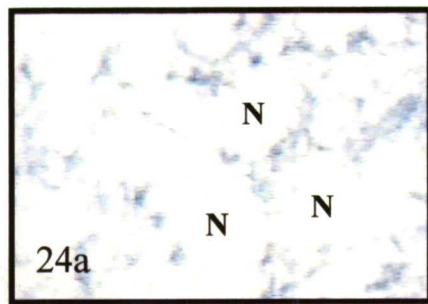


Figura 24. Panorámica y detalle del núcleo supraóptico, donde se puede ver marcaje alrededor de las neuronas (N) concentrándose éste en determinadas zonas. Estadío M1. Figura 24: 1.200x; y figura 24a: 3.600x.

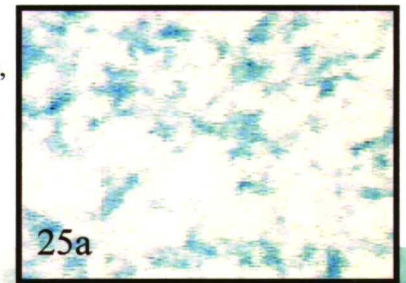


Figura 25. Panorámica y detalle del núcleo paraventricular. Las neuronas tienen marcaje en su alrededor concentrándose en distintas partes dando fuerte reacción. También cabe destacar el incremento demarcaje en las proximidades del tercer ventrículo (IIIv). Estadío A2. Figura 25: 520x; y figura 25a: 2.600x.



Figura 25. Panorámica y detalle del núcleo paraventricular. Las neuronas tienen marcaje en su alrededor concentrándose en distintas partes dando fuerte reacción. También cabe destacar el incremento demarcaje en las proximidades del tercer ventrículo (IIIv). Estadío A2. Figura 25: 520x; y figura 25a: 2.600x.

Figura 25. Panorámica y detalle del núcleo paraventricular. Las neuronas tienen marcaje en su alrededor concentrándose en distintas partes dando fuerte reacción. También cabe destacar el incremento demarcaje en las proximidades del tercer ventrículo (IIIv). Estadío A2. Figura 25: 520x; y figura 25a: 2.600x.

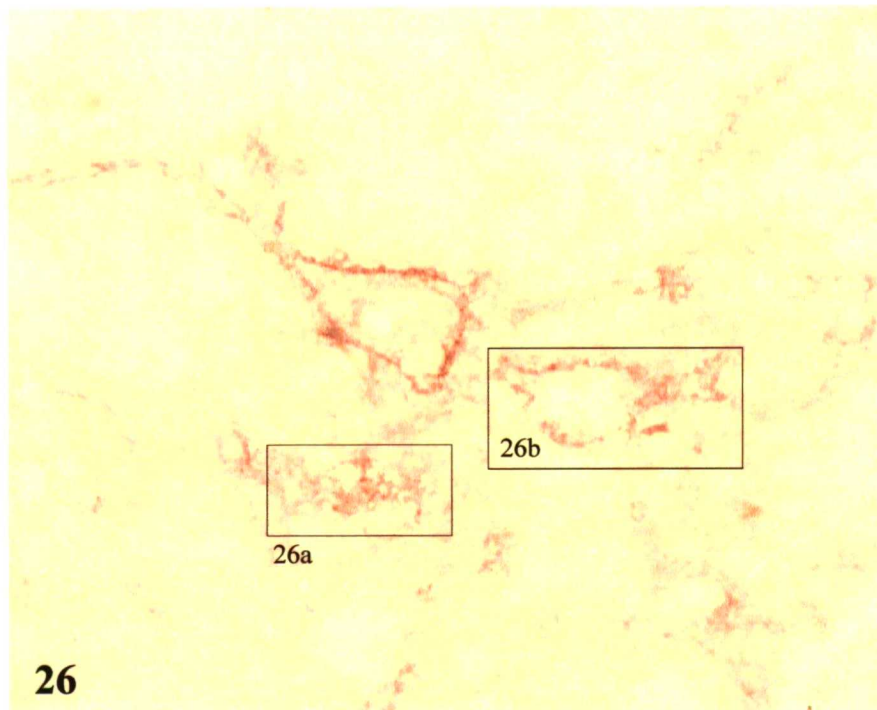


Figura 26. Detalle de neuronas del núcleo magnocelular preóptico. Se puede observar el fino recubrimiento de marcaje descrito como redes perineuronales de tipo clásico. Estadío M3. Figura 26: 2.560x; figura 26a: 5.200x; y figura 26b: 5.390x.

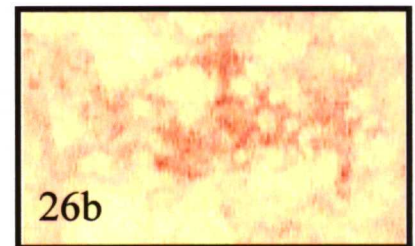
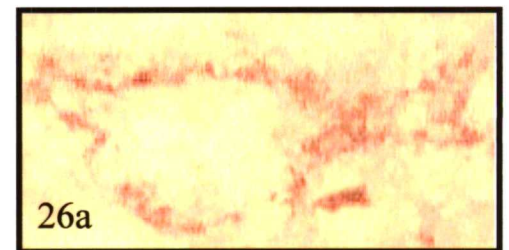
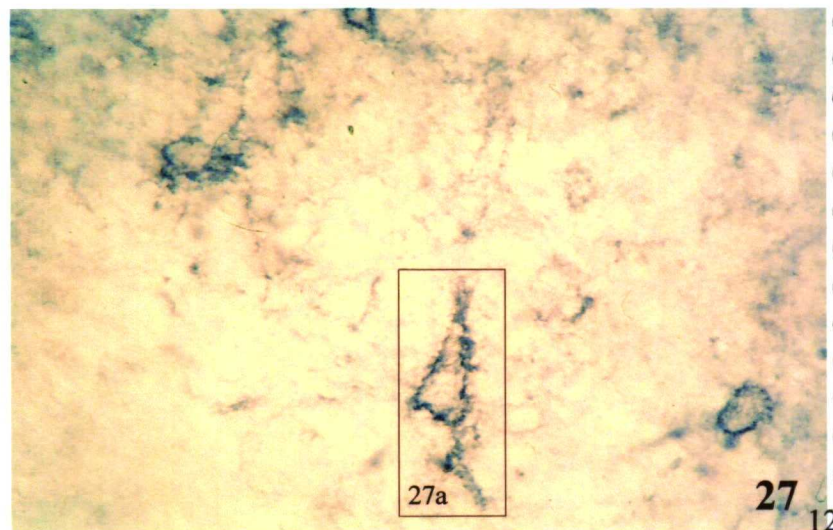
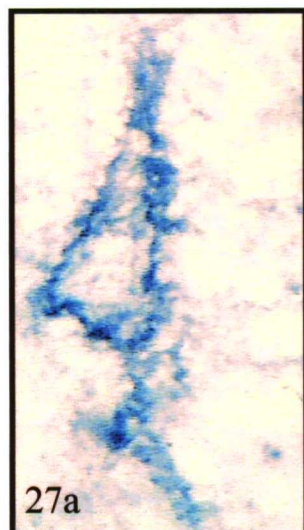


Figura 27. Detalle de neuronas del núcleo magnocelular preóptico. Estadío M3. Figura 27: 1.400x; y figura 27a: 3.370x.



Inmunodetección de condroitín 0-sulfato proteoglucano

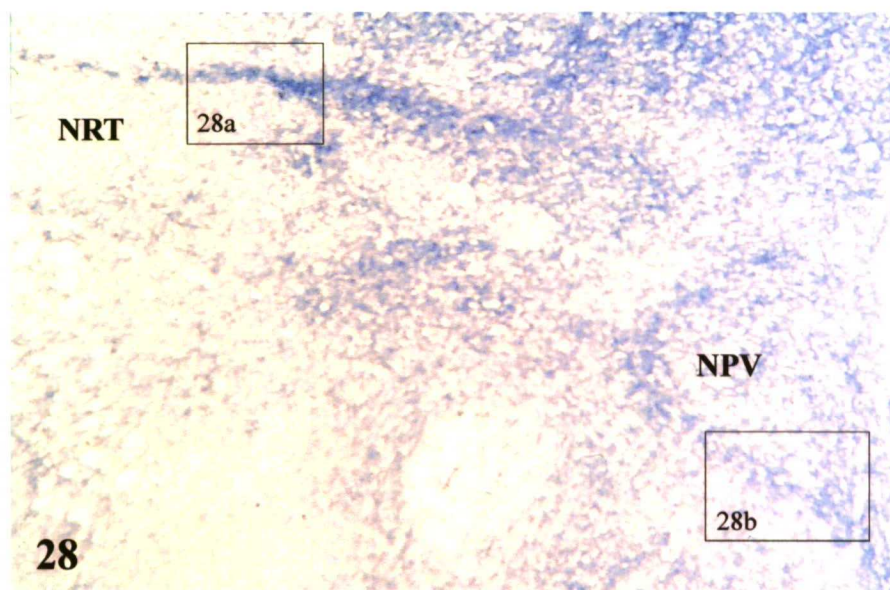
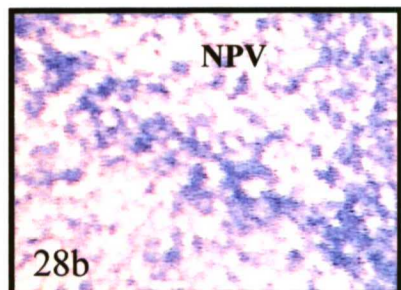
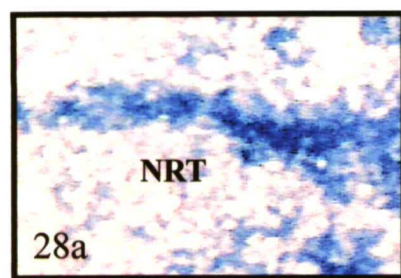


Figura 28. Panorámica del núcleo paraventricular (NPV) y núcleo reticular talámico (NRT). En dicha imagen se puede observar la gran reactividad a este estadio tan temprano. También se observa un incremento de marcaje que se localiza en los límites de los núcleos anteriores (Figuras 28a y 28b). Estadío P1. Figura 28: 350x; figura 28a: 800x; y figura 28b: 940x.

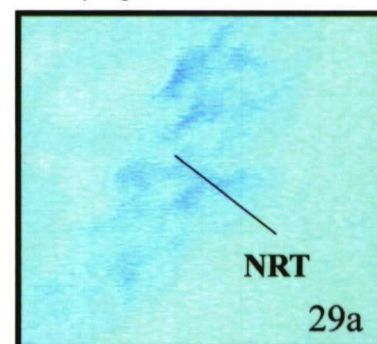
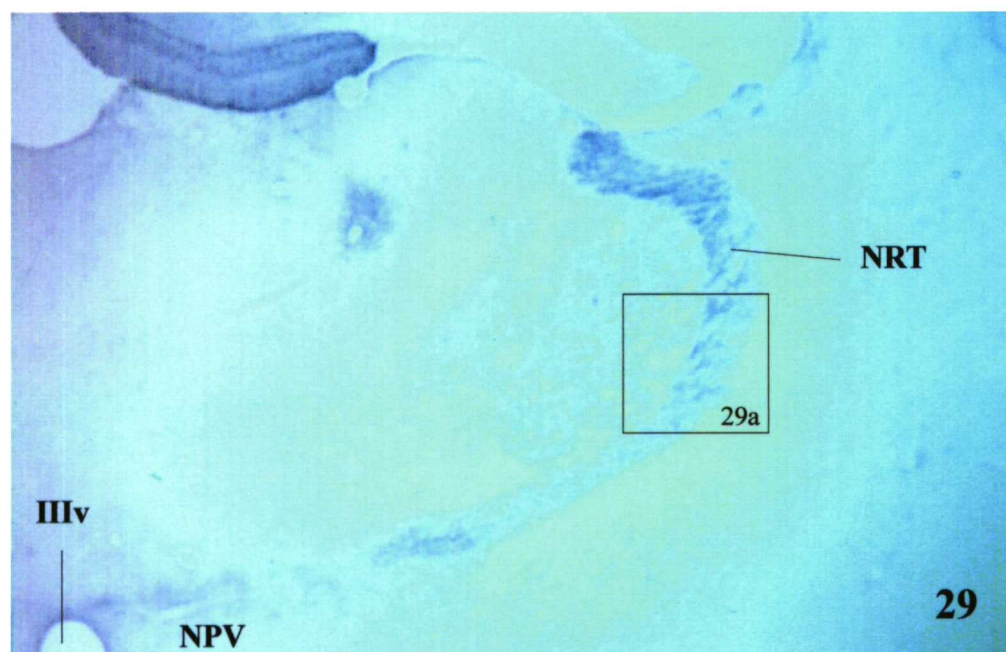
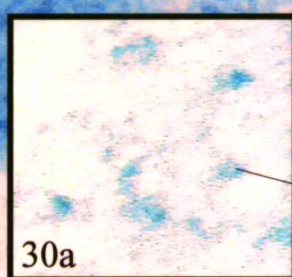
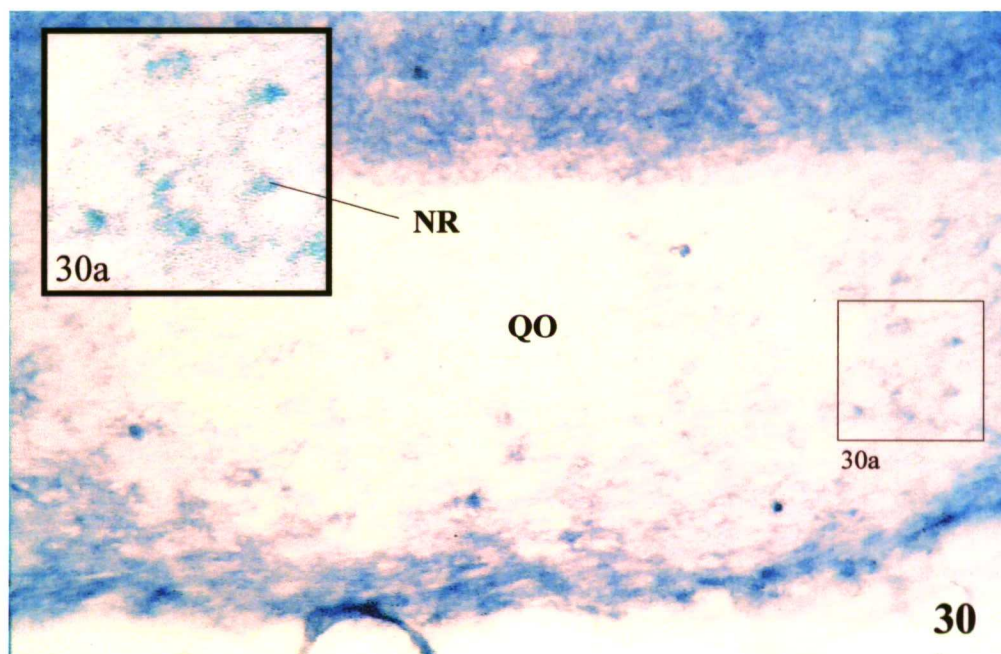


Figura 29. Panorámica del núcleo reticular talámico (NRT). Se observa la fuerte reactividad en dicho núcleo desde la zona dorsal del tálamo hasta la zona dorsal del núcleo paraventricular (NPV). III ventrículo (IIIv). Estadío M5 lactancia. Figura 29: 90x; y figura 29a: 300x.

Figura 30. Panorámica del quiasma óptico (QO). Se observa bajada de reactividad respecto al resto del tejido nervioso. Tiene un carácter fibrilar el marcaje que se lo da al teñirse la superficie de las vainas de mielina apareciendo una fina lámina. Pero donde se acumula el marcaje es en los nodos de Ranvier (NR) (figura 30a). Estadío P14. Figura 30: 1.400x; y figura 30a: 2.700x.



Se realizaron estudios de microscopía electrónica en los tres tipos de proteoglucanos condroitín sulfato como inicio de un estudio posterior que abarcará la detección de los demás componentes de la matriz extracelular hipotalámica.

Inmunolocalización y detección del proteoglucano condroitín 0 sulfato a microscopía electrónica

En el soma de los astrocitos se observa marcaje en el aparato de Golgi, en el retículo endoplásmico rugoso y también en polisomas. Existe marcaje en vesículas y gliofilamentos de prolongaciones astrocitarias.

En el soma neuronal podemos ver marcaje en el retículo endoplásmico rugoso en el aparato de Golgi y en vesículas. La cantidad de puntos encontrados es mayor que en los astrocitos. Las dendritas tienen gran cantidad de marcaje, que se distribuye en su interior de forma no aleatoria concentrándose en distintas zonas. No todas las dendritas están igual de marcadas, unas tienen mucho más marcaje que otras. Los axones están intensamente marcados. Aparecen gran cantidad de puntos en las vesículas de secreción. Se observan en el interior de las vesículas.

De esta forma el marcaje en el interior de las células se concentra en las neuronas, y dentro de ellas en muchas dendritas con gran cantidad de puntos, y sobre todo, en las vesículas de sección que aparecen en los axones.

En la matriz extracelular aparecen grandes “parches” de marcaje rodeando dendritas de manera localizada, es decir, aparecen sólo en determinadas zonas de la dendrita. Aparece un marcaje polarizado, que parece tener que ver con prolongaciones astrocitarias. También aparece este tipo de marcaje en determinadas zonas de los axones, que también parece tener relación con prolongaciones astrocitarias.

Además se observa la aparición de mayor intensidad de marcaje en las estructuras que rodean los vasos sanguíneos. De esta forma se observa un aumento de marcaje de matriz extracelular. El marcaje de matriz extracelular que se observa con este anticuerpo no parece estar asociado a ninguna membrana plasmática, ni del astrocito, ni de la neurona.

Figura 1: En la imagen se puede observar gran cantidad de prolongaciones y en el centro un casquete de soma neuronal. Se aprecia marcaje de forma discontinua concentrándose en zonas puntuales. Se relaciona con la superficie de dendritas (fig. 1a) y también con prolongaciones astrocitarias y matriz extracelular (fig. 1b, 1b1, 1c y 1c1).
Figura 1: 6.400x; figura 1a: 14.700x; figura 1b: 8.100x; figura 1b1: 16.200x; figura 1c: 25.000x; y figura 1c1: 34.500x.

Immunodetección de condroitín 0-sulfato con oro coloidal

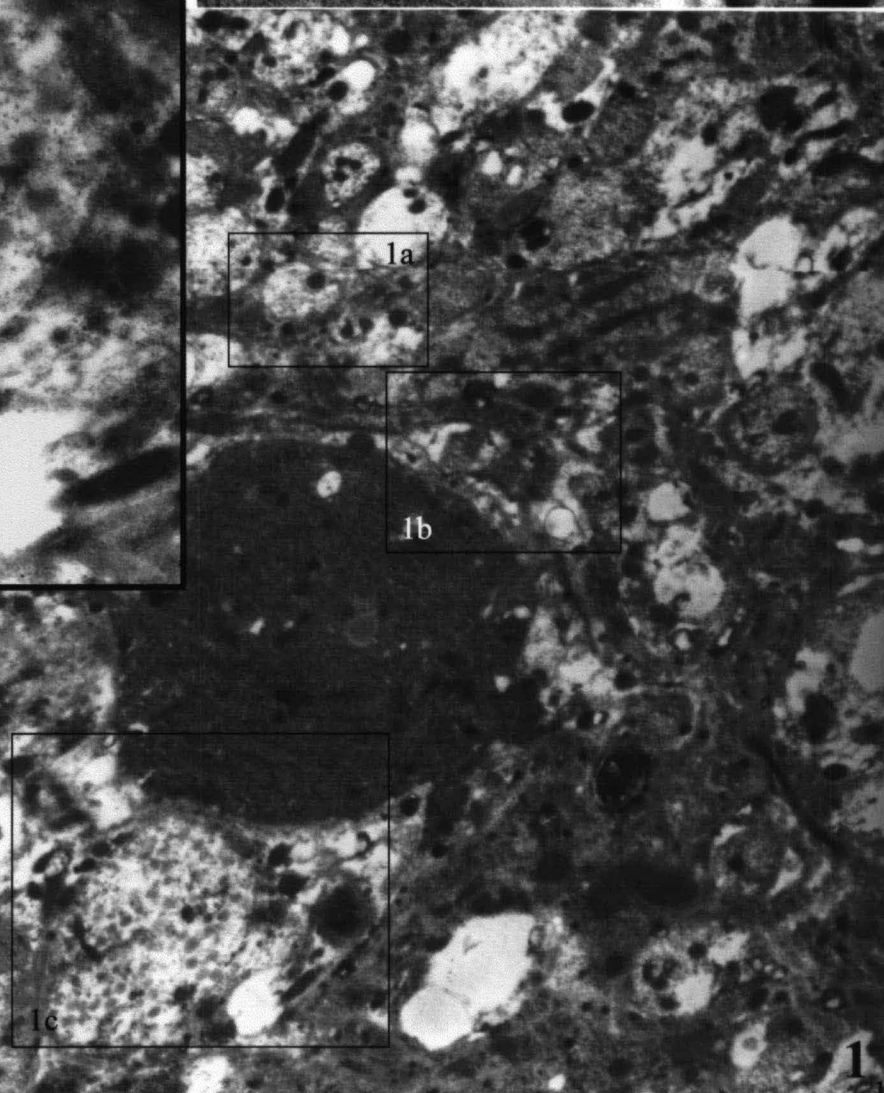
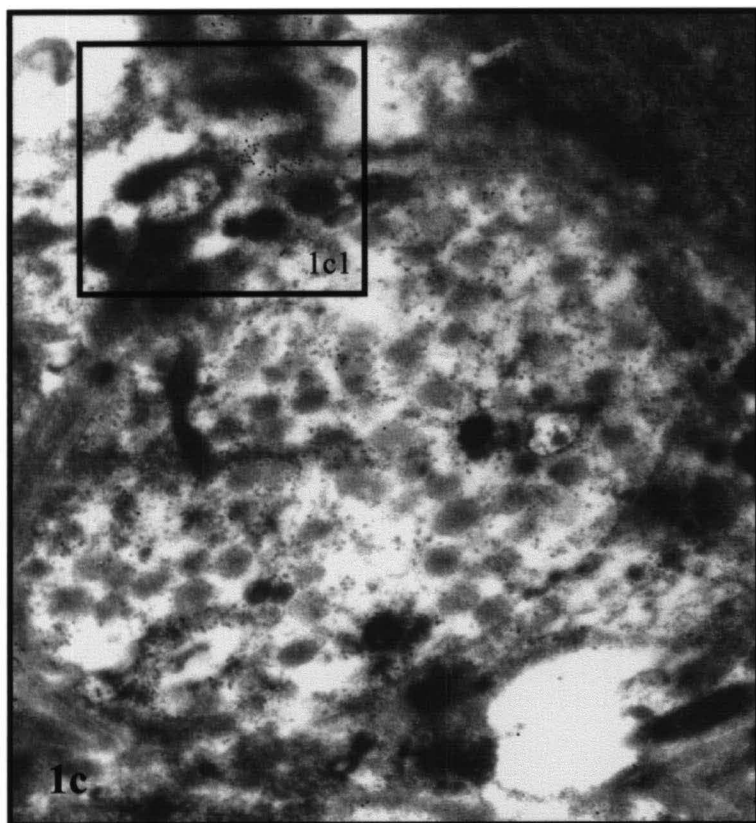
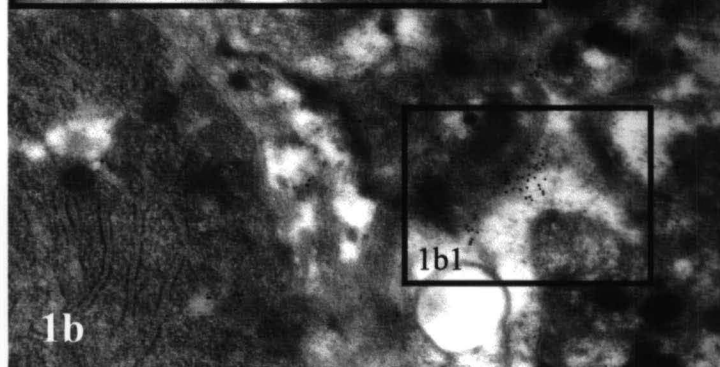
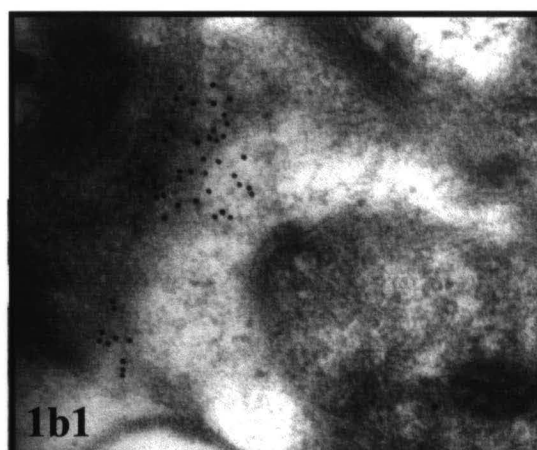
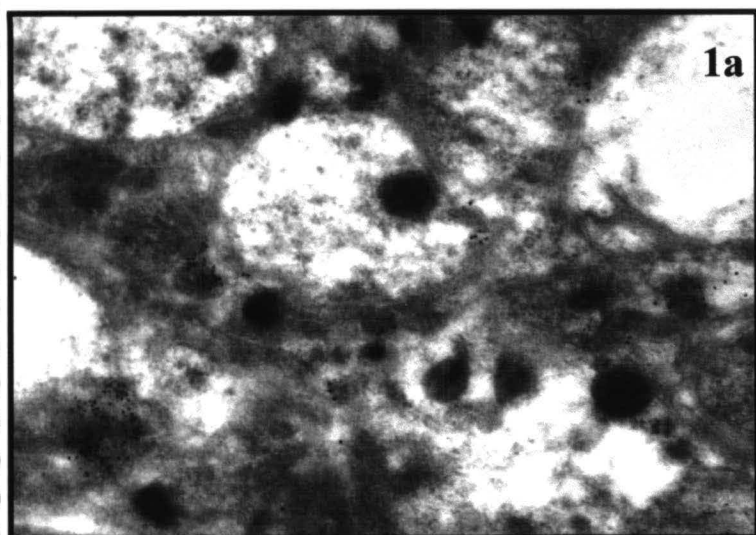


Figura 2: Panorámica de una neurona magnocelular del núcleo supraóptico. Se puede observar marcaje en la superficie de la neurona (fig. 2a y 21a) concentrándose en lugares puntuales. Aparece marcaje también en la superficie de dendritas (fig. 2d) y en matriz extracelular (fig. 2b). Asimismo, se aprecia marcaje en el citoplasma de la neurona, correspondiéndose con el retículo endoplásmico rugoso (fig. 2c). Figura 2: 7.000x; figura 2a: 8.200x; figura 2a1: 24.600x; figura 2b: 21.000x; figura 2c: 25.800x; y figura 2d: 6.000x.

Immunodetección de condroitín 0-sulfato con oro coloidal

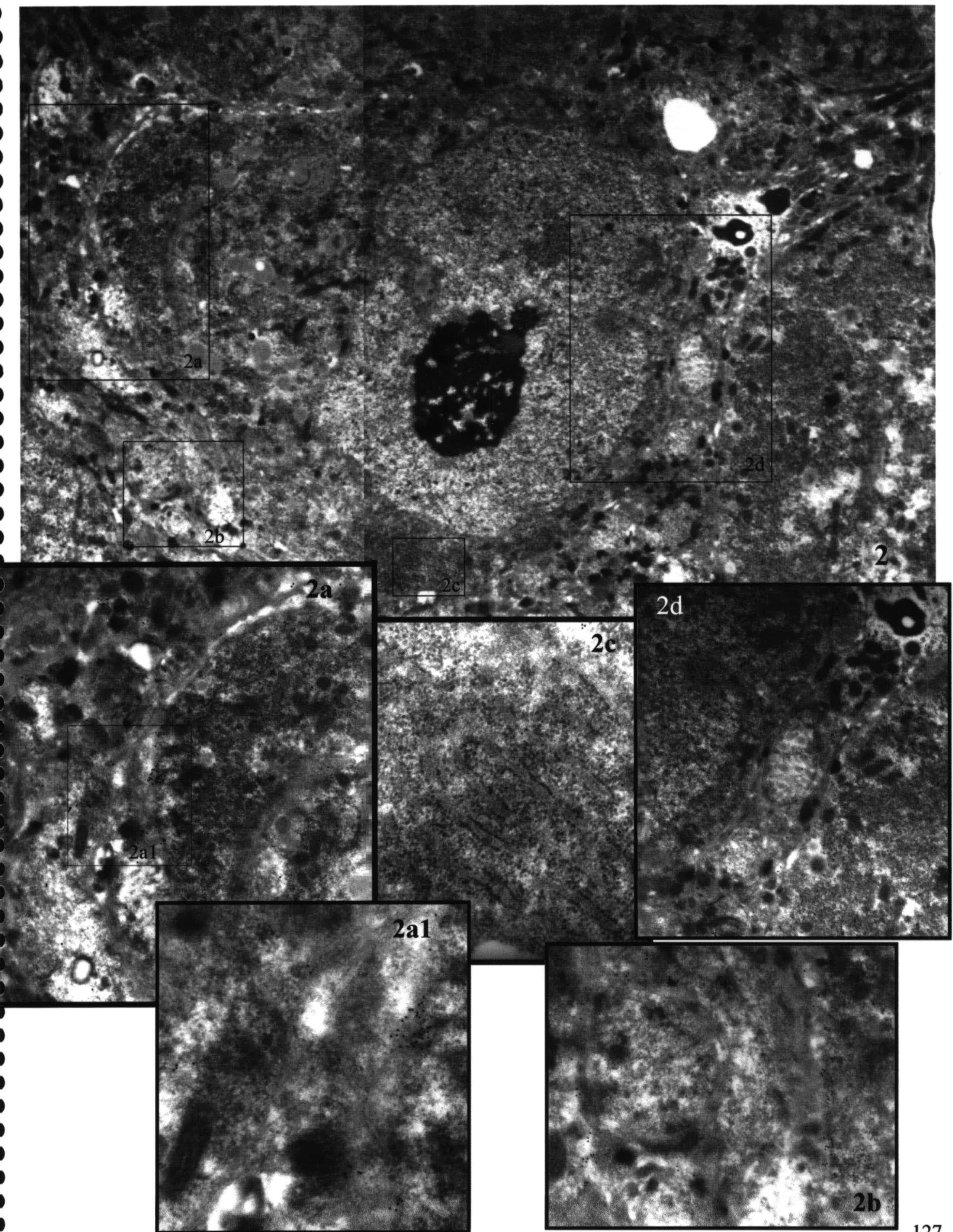


Figura 3: Panorámica de la superficie de un vaso sanguíneo donde se puede observar el marcaje en “parche” entre prolongaciones de astrocitos (fig. 3a). Figura 3: 2.700x ; y figura 3a: 14.900x.

Figura 4: Panorámica de una sección transversal de un axón cargado de vesículas de secreción (fig. 4a), donde se aprecia marcaje en algunas de estas vesículas, no en todas. Se acumula el marcaje en la superficie de las vesículas de secreción marcadas (fig. 4a1 y fig. 4a2). Figura 4: 7.800x; figura 4a: 20.000x; figura 4a1: 42.500x; y figura 4a2: 28.500x.

Inmunodetección de condroitín 0-sulfato proteoglicano con oro coloidal

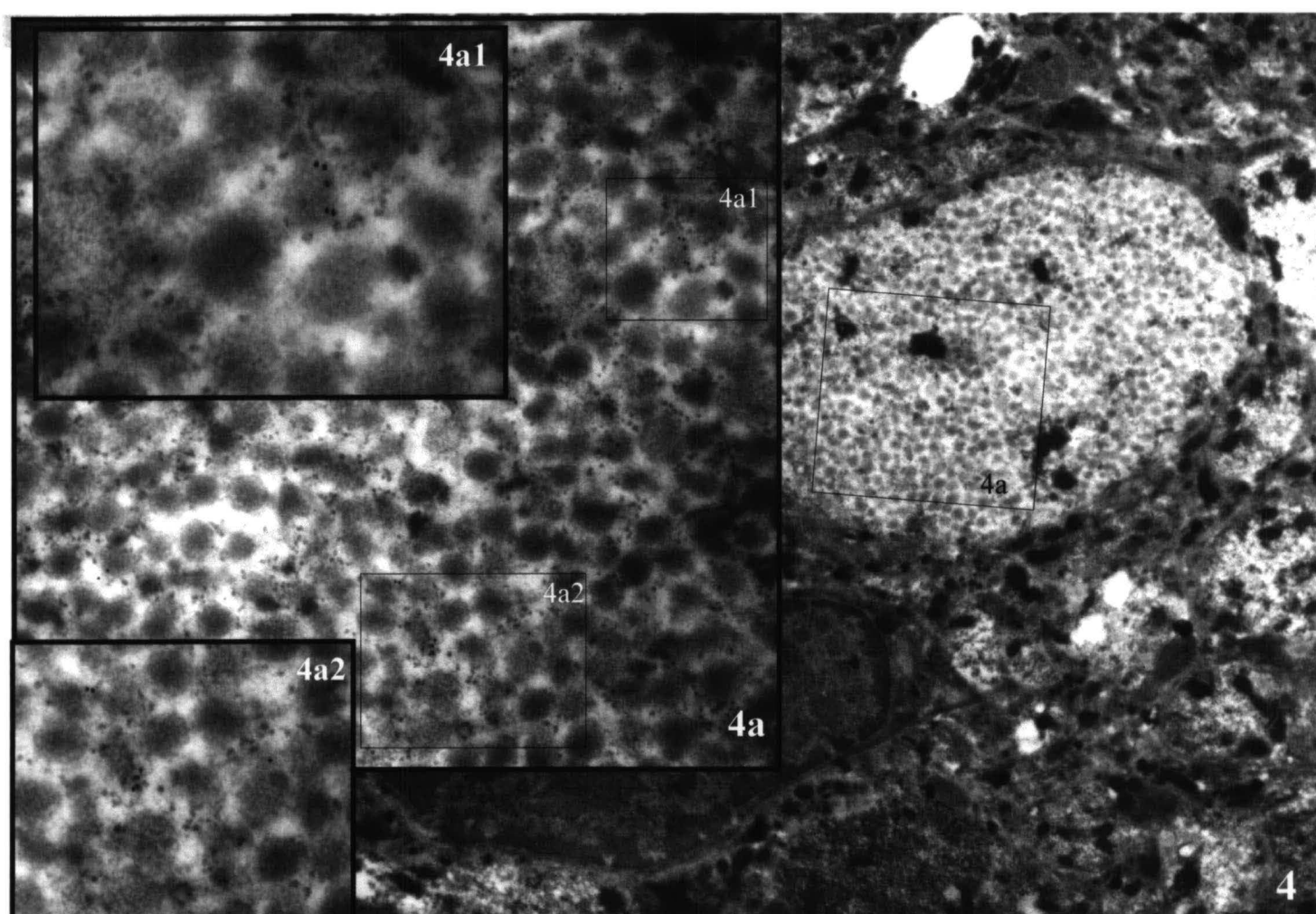
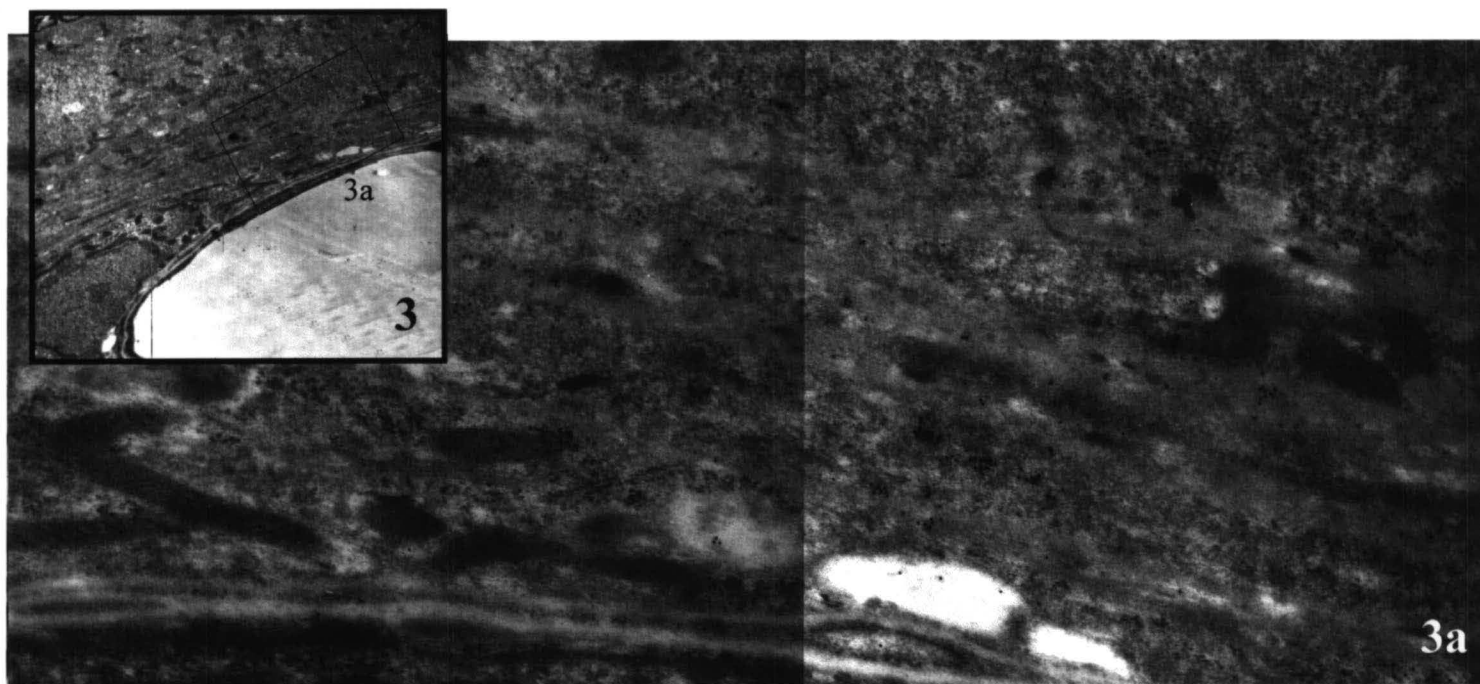
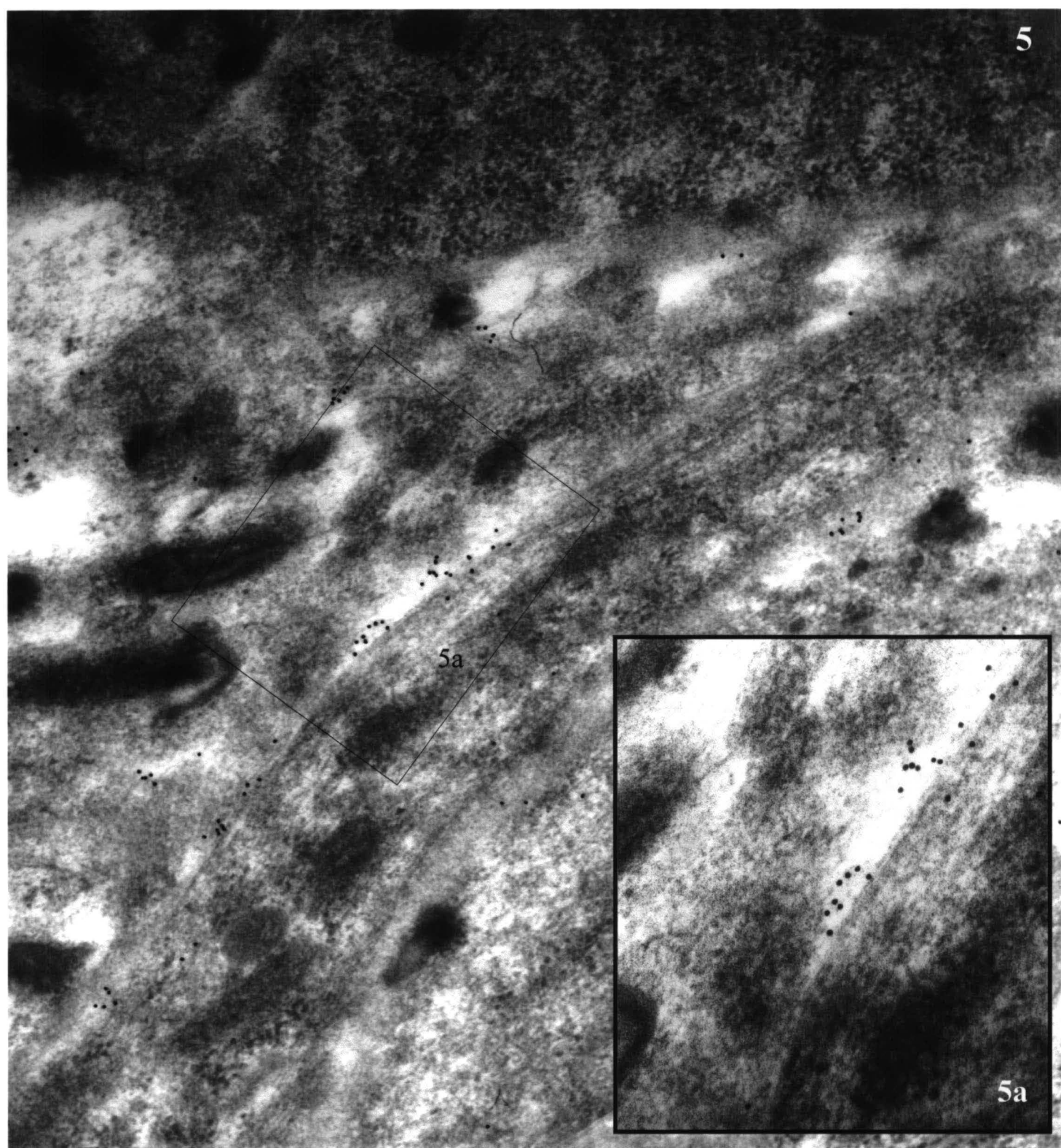


Figura 5: Panorámica del soma de una neurona que la recubre una prolongación astrocitaria. Se observa marcaje en vesículas del citoplasma neuronal así como en su superficie, en la superficie de la prolongación astrocitaria y entre medias de las dos, en la matriz extracelular. Figura 5: 38.600; y figura 5a: 61.800x.

Inmunodetección de condroitín 0-sulfato proteoglicano con oro coloidal



6.- Distribución y localización del proteoglicano condroitín 4-sulfato

Estadio P1:

El núcleo supraóptico (figs. 31 y 32) es positivo al marcaje, con igual intensidad que el neuropilo, con lo que no destaca del resto. Lo mismo pasa con el núcleo paraventricular. El núcleo magnocelular preóptico no se distingue del resto del neuropilo al estar igualmente marcado. El quiasma óptico es positivo y el epéndimo es negativo. El marcaje en el neuropilo es muy abundante.

Estadio P7:

El núcleo supraóptico (fig. 33) es positivo con el mismo tono que el neuropilo. El núcleo paraventricular tiene un ligero menor tono de marcaje respecto al neuropilo aunque también es positivo. El núcleo magnocelular preóptico no se distingue confundándose con el resto del neuropilo. El quiasma óptico es positivo. El epéndimo es negativo, incrementándose el marcaje en la membrana limitante interna, inmediatamente debajo de los endimocitos.

Estadio P14:

El núcleo supraóptico es positivo marcado homogéneamente en todo él, salvo en la zona más ventral, donde no existen células que es ligeramente más teñido. El núcleo paraventricular posee un tono menor de marcaje con relación al neuropilo. El núcleo magnocelular preóptico se confunde con el resto de marcaje del neuropilo. El epéndimo continúa siendo negativo con incremento de marcaje en la zona de la membrana limitante interna. El quiasma óptico (fig. 37) sigue siendo positivo pero ligeramente menor que el neuropilo. Se observa marcaje que rodea los nodos de Ranvier y la vaina

de mielina (fig. 37a). Aparece marcaje en la membrana limitante interna subependimaria. Existe marcaje perivascular.

Estadio P21

Hay un descenso general de marcaje en el neuropilo. El núcleo supraóptico aparece bien marcado positivamente con igual tono que el neuropilo. De la misma manera se observa el núcleo paraventricular. El núcleo magnocelular preóptico continúa estando marcado con igual tono que el neuropilo. El epéndimo sigue siendo negativo, y aumenta el marcaje en la membrana limitante interna. El quiasma óptico baja su marcaje notablemente quedando marcaje puntual que se asocia con los nodos de Ranvier. Aparece marcaje en la limitante externa. Alrededor del ventrículo se observa marcaje, siendo más intenso cuanto más cerca de los endimocitos. Se mantiene un marcaje perivascular.

Estadio M1

El marcaje del neuropilo desciende. El núcleo supraóptico es positivo, más marcado que el neuropilo, estando más marcado en su parte dorsal y ventral. La zona periventricular está marcada, siendo más marcada la parte interior que va descendiendo hacia el neuropilo. El núcleo paraventricular (fig. 35) se encuentra marcado, en su parte más medial más que la distal al coincidir con el incremento de marcaje de la zona periventricular. Además, se observa mayor marcaje de forma puntiforme en las neuronas magnocelulares del núcleo. El núcleo magnocelular preóptico es positivo pero no destaca del marcaje general del neuropilo. El epéndimo sigue siendo negativo y el quiasma óptico en general aparece negativo y sólo es positivo puntualmente en nodos de

Ranvier. Aparece también un marcaje perivascular difuso. Sigue observándose la membrana limitante externa teñida.

Estadio M3

El marcaje es similar al que se da en estadio M1, pero con mayor bajada de marcaje del neuropilo. En el núcleo paraventricular (fig. 36) se puede observar cómo el marcaje no aparece continuo en toda la superficie celular sino que se concentra en determinadas zonas de la superficie de la célula.

Estadio A1 y A2

El marcaje es igual que en M3. Los lugares donde aparece son los mismos, sin embargo, varía el tipo de marcaje. En M3 está más difuso, pero según observamos los estadios A1 y A2 este marcaje se hace mucho más definido. En el núcleo supraóptico (fig. 34), como en el resto estudiado, se aprecia un marcado descenso de marcaje. En el quiasma óptico (fig. 38) se hace mucho más definido el marcaje de los nodos de Ranvier dando un aspecto de marcaje puntiforme y con pequeños parches (figs. 38a y 38b).

En general, el marcaje del neuropilo disminuye con el paso del tiempo en las ratas. Sin embargo, los núcleos supraóptico y paraventricular mantienen parte de marcaje a la vez que disminuye el del neuropilo. El epéndimo es negativo en todos los estadios mientras que el límite del epéndimo con el tiempo gana marcaje. Cabe destacar que en corteza piriforme aparece marcaje en la capa molecular formando una banda.

Tabla de resultados con anticuerpos contra condroitín 4-sulfato proteoglucano

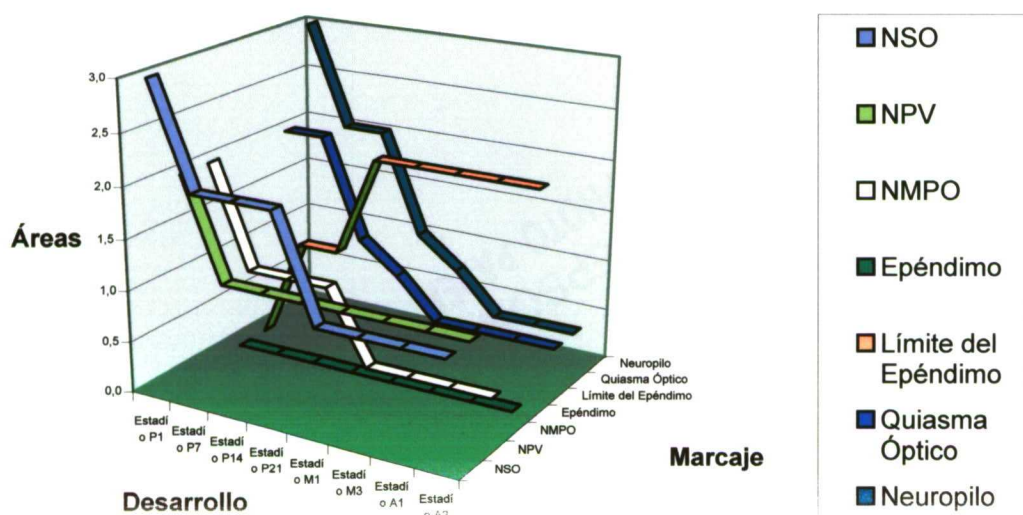
C4SPG	NSO	NPV	NMPO	Epéndimo	Lim Epénd	QO	Neuropilo
Estadio P1	+++	++	++	-	-	++	+++
Estadio P7	++	+	+	-	+	++	++
Estad. P14	++	+	+	-	+	+	++
Estad. P21	++	+	+	-	++	+/-	+
Estadio M1	+	+	-/+	-	++	-/+	+/-
Estadio M3	+	+	-/+	-	++	-/+	-/+
Estadio A1	+	+	-/+	-	++	-/+	-/+
Estadio A2	+	+	-/+	-	++	-/+	-/+

Leyenda de siglas:

- C4SPG: Condroitín 4-sulfato proteoglucano
- NSO: Núcleo supraóptico
- NPV: Núcleo paraventricular
- NMPO: Núcleo magnocelular preóptico
- Epéndimo: Ependimocitos
- Lim Epéndimo: Limitante interna endimaria
- QO: Quiasma óptico
- Neuropilo: Matriz extracelular marcada donde no hay núcleos

Leyenda de signos:

- marcaje nulo
- /+ sin marcaje salvo en pequeñas zonas
- +/- marcaje positivo en su mayoría, con zonas negativas
- +
- ++ marcaje positivo intenso
- +++ marcaje positivo fuerte
- ++++ marcaje positivo muy fuerte

Gráfico del proteoglucano condroitín 4-sulfato

Inmunodetección de condroitín 4-sulfato proteoglicano

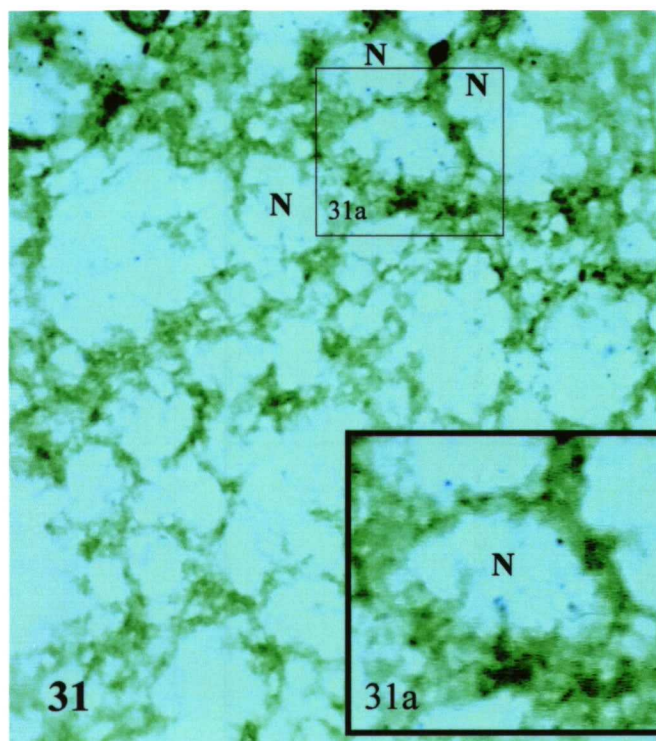


Figura 31. Detalle del núcleo supraóptico donde se puede observar la reacción que aparece entre las fibras que rodean a las neuronas (N). También es de destacar la no homogénea reacción alrededor. Estadío. P1. Figura 31: 2.000x; figura 31a: 3.400x.

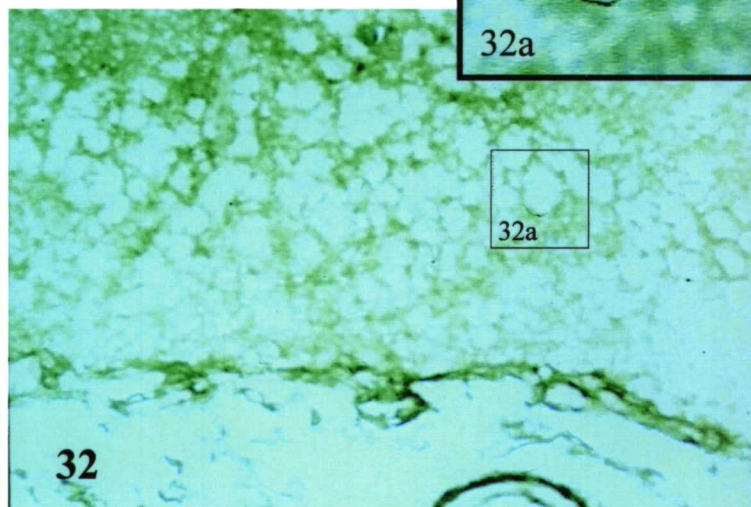
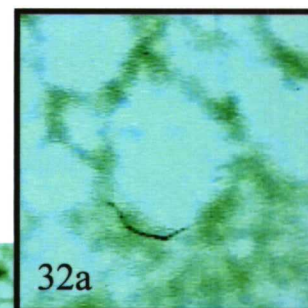


Figura 32. Panorámica del núcleo supraóptico. El marcaje es muy amplio y se distribuye más o menos homogéneo por todo el hipotálamo. Estadío. P1. Figura 32: 1.120x; y figura 32a: 3.000x.

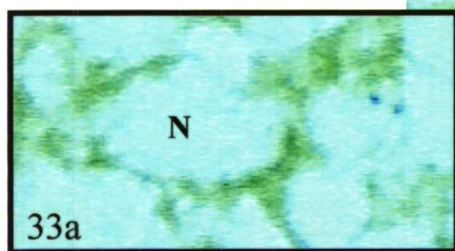
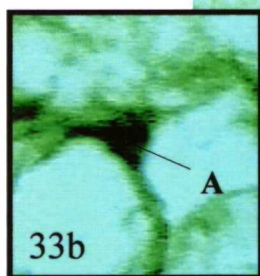
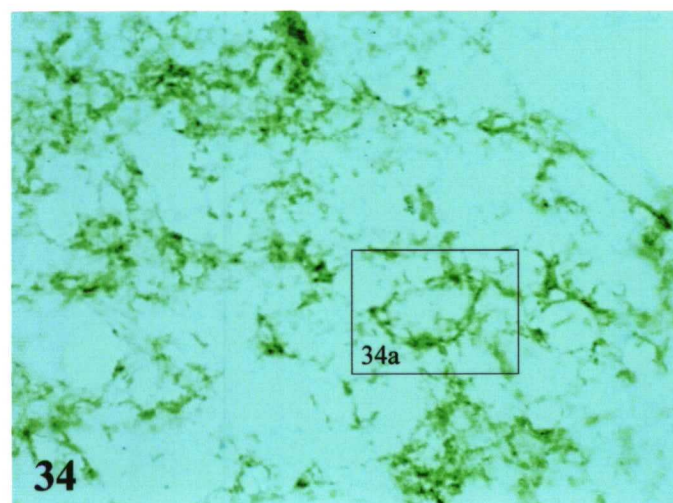
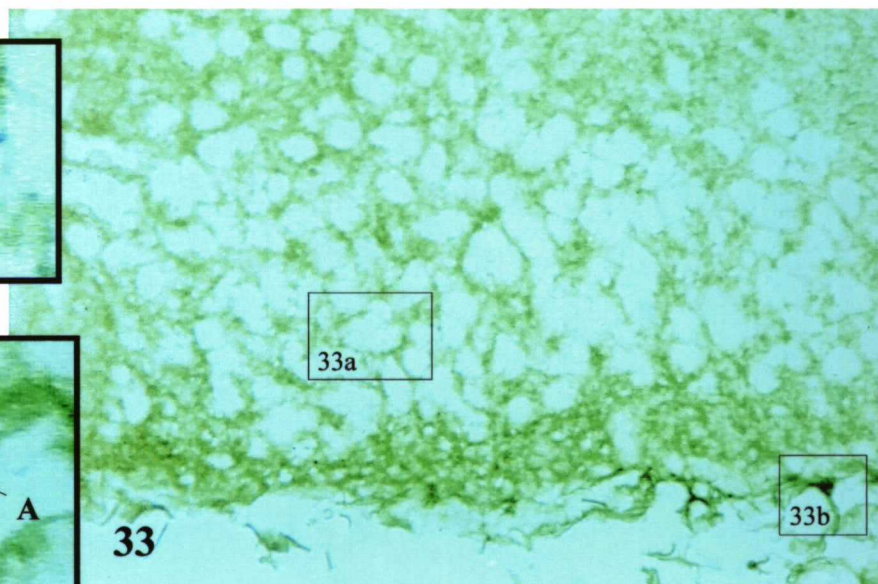


Figura 33. Panorámica del núcleo supraóptico. Donde se puede observar la marcada polaridad en el marcaje (figura 33a). También se observa fuertemente marcadas otras células como



33



los astrocitos (A) (figura 33b). Un astrocito que forma parte de la barrera limitante externa y también de la zona de dendritas este núcleo. Estadío P7. Figura 33: 1.450x; figura 33a: 3.900x; y figura 33b: 5.800x.

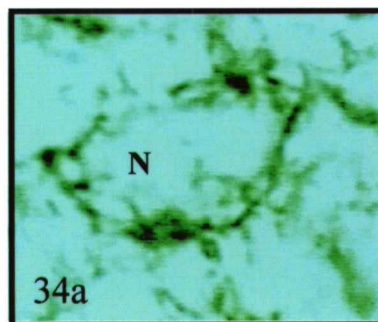


Figura 34. Detalle del núcleo supraóptico. El marcaje en este estadio tan avanzado ha perdido fuerza en la reacción y pasa de estar muy distribuido a concentrarse en determinadas neuronas (figura 34a). El marcaje sobre las neuronas (N) se concentra en la superficie y tiene aspecto de lámina que recubre la célula. Estadío A2. Figura 34: 1.500x; y figura 34a: 3.500x.

Inmunodetección de condroitín 4-sulfato proteoglucano

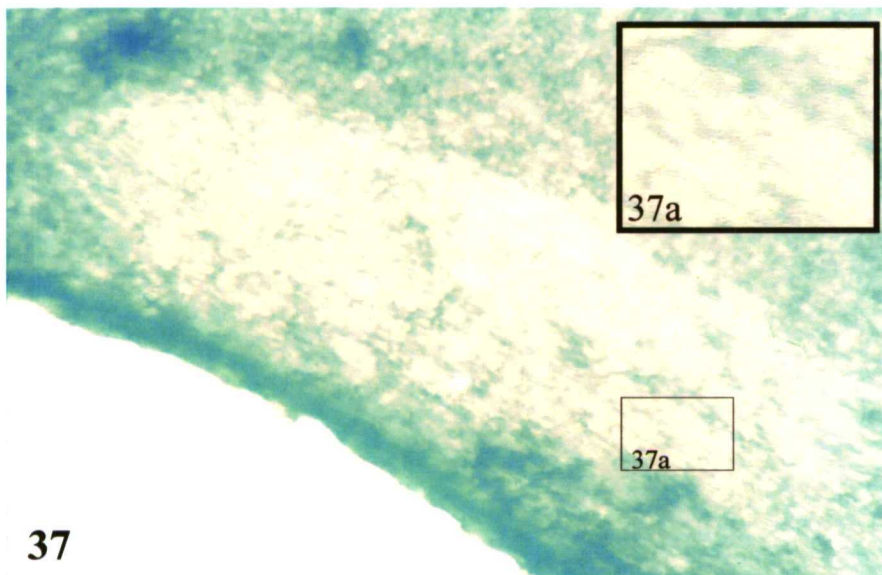
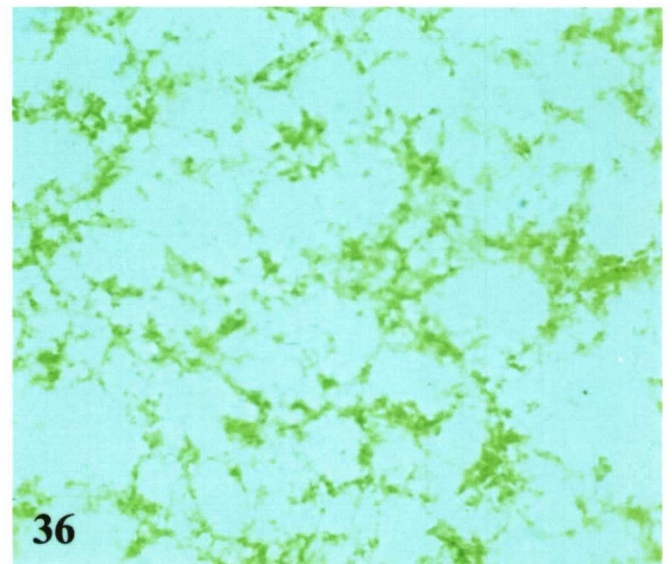
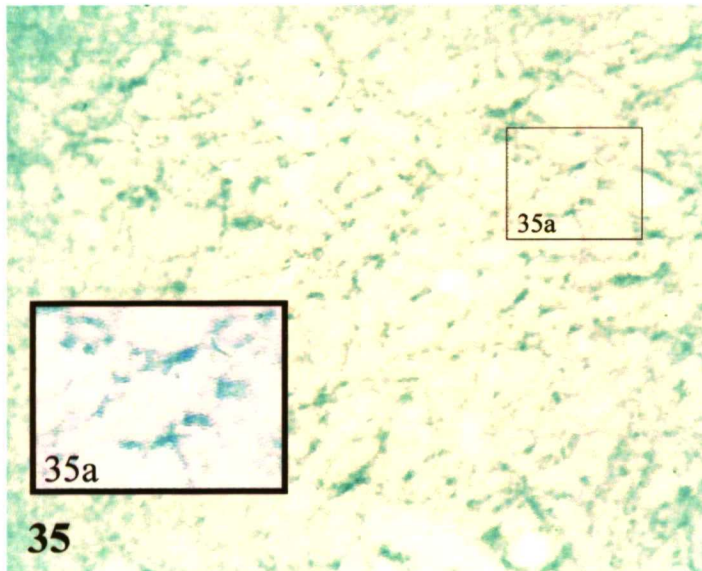


Figura 35. Panorámica del núcleo paraventricular en el que se puede observar marcaje alrededor de las neuronas. El marcaje parece concentrarse en determinadas zonas (figura 35a). Estadío M1. Figura 35: 2.300x; y figura 35a: 4.700x.

Figura 36. Detalle del núcleo paraventricular donde aparece marcaje alrededor de neuronas. Se sigue acumulando marcaje en zonas puntuales entre las células. Sin embargo, aparece menos cantidad de marcaje que en el estadío anterior. Estadío M3. 1.400x.

Figura 37. Vista panorámica del quiasma óptico donde se observa la gran reacción que se observa en este temprano estadío acumulándose gran cantidad de marcaje en nodos de Ranvier entre las vainas de mielina. Pero en general, el marcaje es menor que en el tejido que lo rodea. Estadío P14. Figura 37: 1.200x; y figura 37a: 3.200x.

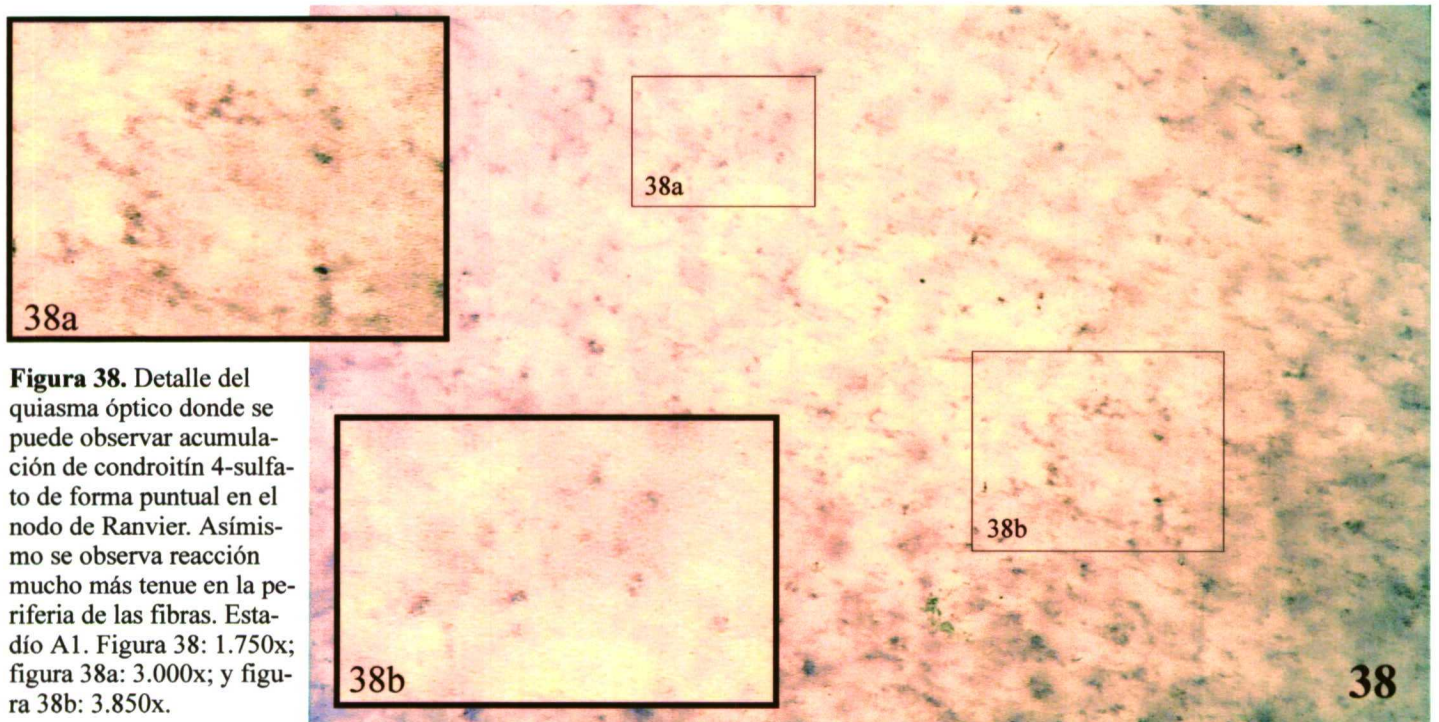


Figura 38. Detalle del quiasma óptico donde se puede observar acumulación de condroitín 4-sulfato de forma puntual en el nodo de Ranvier. Asimismo se observa reacción mucho más tenue en la periferia de las fibras. Estadío A1. Figura 38: 1.750x; figura 38a: 3.000x; y figura 38b: 3.850x.

Inmunolocalización y detección a microscopía electrónica del proteoglicano condroitín 4 sulfato

Aparecen marcados el pericarion de los astrocitos. Se observan muchos puntos en su citoplasma, concentrándose en el retículo endoplásmico rugoso, en aparato de Golgi, en vesículas y también algunos pocos en gliofilamentos. Pero donde existe mayor cantidad de marcaje es en la superficie externa de la membrana plasmática, no sólo en el pericarion, sino también, y de forma mucho más abundante en sus prolongaciones. La mayor cantidad de marcaje detectada se sitúa alrededor de las dendritas y las sinapsis, en la superficie de las prolongaciones astrocitarias.

Las neuronas también aparecen marcadas, pero mucho menos que los astrocitos. El aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso y vesículas concentran los puntos. No suelen aparecer puntos asociados a la membrana plasmática neuronal ni en el soma, ni en dendritas. En el interior de las dendritas es difícil encontrar algún marcaje.

También aparecen puntos menos numerosos no ligados a las membranas plasmáticas de las prolongaciones de esta glía. A mayor detalle se observa interaccionando con agregados de tipo proteico.

No aparece marcaje de forma localizada como “parches”, es más, suele ser muy concreto y en determinadas zonas. Y dentro de estas zonas, pueden encontrarse ciertas áreas con más marcaje que otras. Poniendo de manifiesto la existencia de polarización.

Figura 6: Panorámica de la zona de fibras del núcleo supraóptico donde se puede observar marcaje alrededor de las dendritas (fig. 6b) de forma continua, en la matriz extracelular y en las prolongaciones astrocitarias (fig. 6a). Figura 6: 14.000x; figura 6a: 37.600x; y figura 6b: 23.700x.

Inmunodetección de condroitín 4-sulfato proteoglicano con oro coloidal

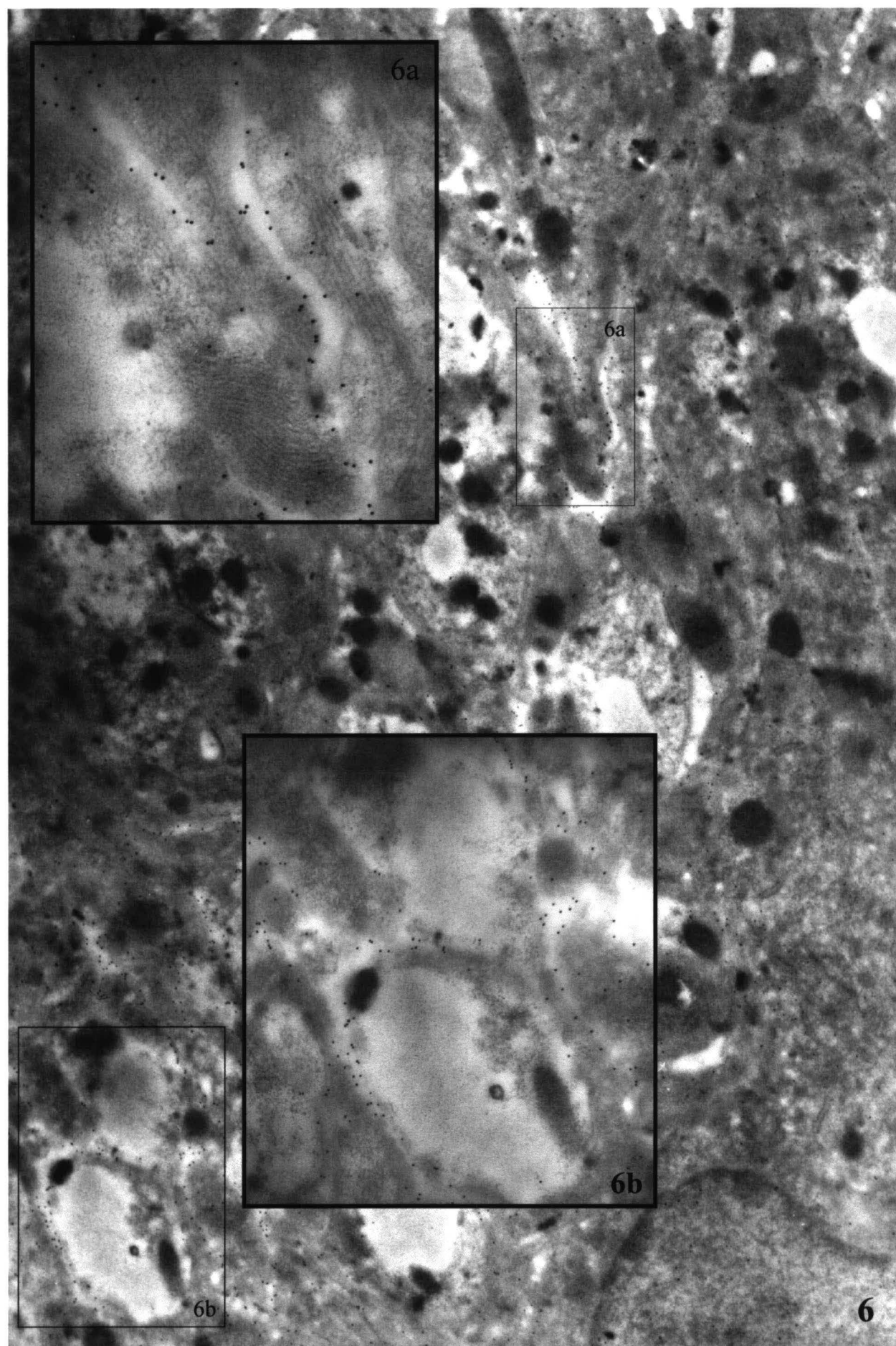
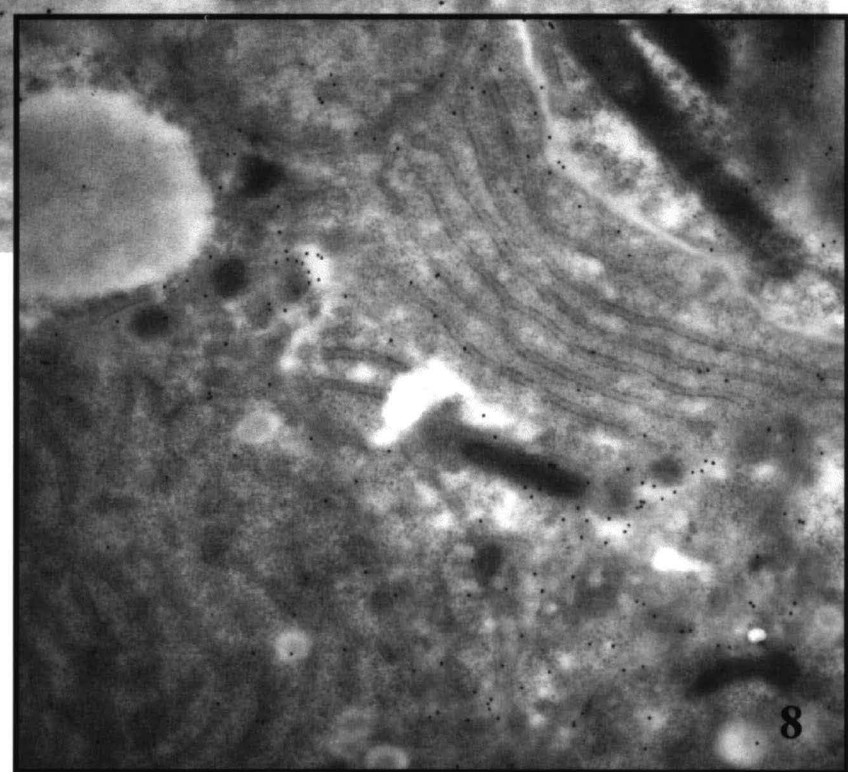
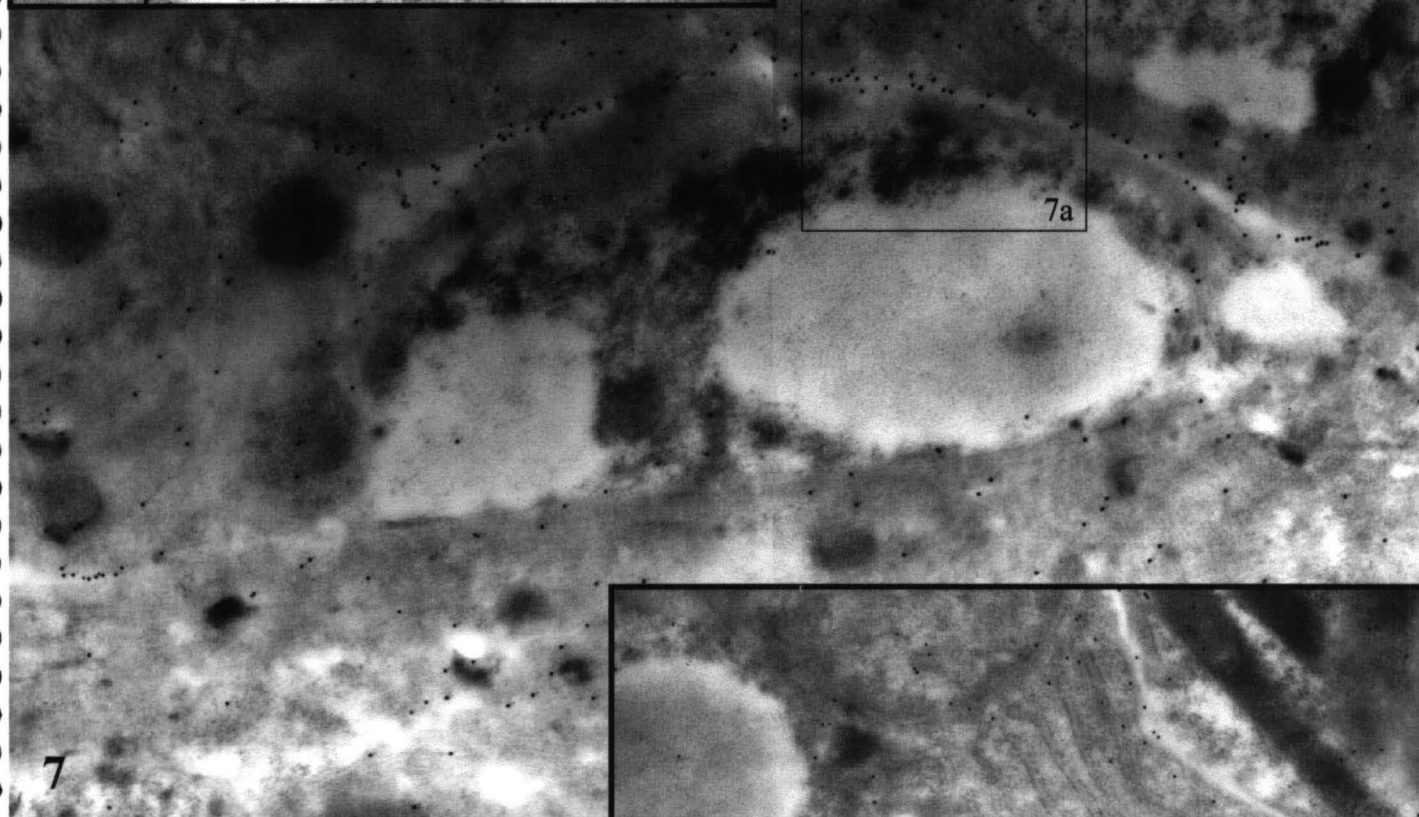
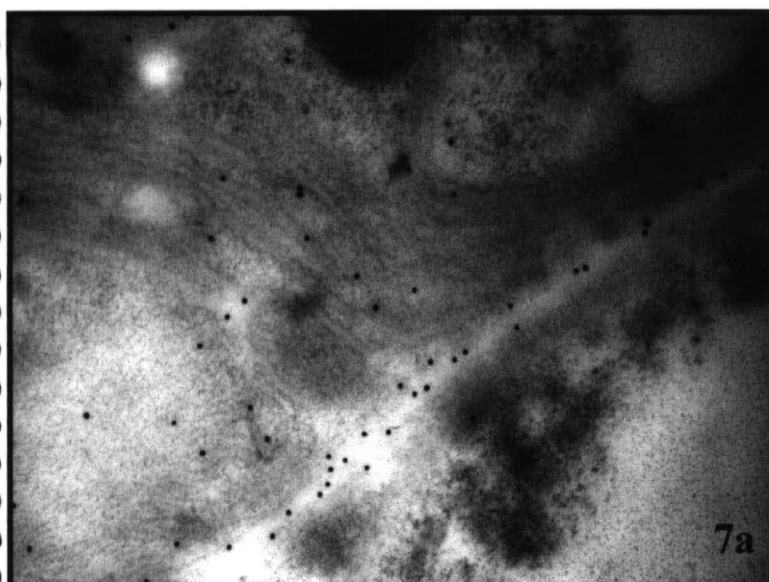


Figura 7: Panorámica de sección transversal de dendritas en la zona de fibras del núcleo supraóptico donde se observa un fuerte marcaje en la matriz extracelular. También se puede observar un marcaje de forma puntual en los gliofilamentos de prolongaciones de astrocitos (fig. 7a). Figura 7: 19.400x; y figura 7a: 40.000x.

Figura 8: Detalle del citoplasma de una neurona en su soma donde se aprecia marcaje en el retículo endoplásmico rugoso así como en numerosas vesículas.

Inmunodetección de condroitín 4-sulfato proteoglicano con oro coloidal



7.- Distribución y localización del proteoglucano condroitín 6-sulfato

Estadio P1:

Todo el neuropilo está homogéneamente marcado, no apreciándose diferencias en este estadio. Es decir, núcleo supraóptico (fig. 39), paraventricular (fig. 43), magnocelular preóptico, reticular talámico, quiasma óptico y demás son positivos, apareciendo gran cantidad de marcaje rodeando las células, concentrándose más en determinadas áreas de la superficie de ésta. El epéndimo es negativo para la inmunodetección (fig. 43).

Estadio P7:

El neuropilo sigue marcado pero menos que en el estadio P1. El núcleo supraóptico es positivo, con mayor marcaje en su zona más inferior que se continúa con la capa molecular de corteza piriforme. El núcleo paraventricular también es positivo, pero con igual marcaje que el neuropilo. El núcleo magnocelular preóptico es positivo pero sin destacar del marcaje del neuropilo. El quiasma óptico es positivo, pero en su parte dorsal aumenta el marcaje separándolo del marcaje del neuropilo. El epéndimo es negativo al marcaje. Existe ligero marcaje subependimario en la limitante interna.

Estadio P14:

El núcleo supraóptico tiene igual marcaje que en el estadio P7, positivo pero con mayor mayor marcaje en zona ventral. El núcleo paraventricular es igualmente marcado que en el estadio anterior. El núcleo magnocelular preóptico al igual que en P7 es positivo sin destacar sobre el marcaje del neuropilo. El quiasma óptico sigue positivo.

El epéndimo es negativo. La zona subependimaria y periventricular son positivas. Además existe marcaje perivascular.

Estadio P21:

Aparece un descenso en el marcaje del neuropilo. El núcleo supraóptico (fig. 40) es positivo con igual tono que el neuropilo y la zona ventral más intensa (fig. 40a), observándose una ligera capa de marcaje simulando el límite de la zona de los somas con la zona de las dendritas. El núcleo paraventricular también resulta positivo con tono igual que el neuropilo. El núcleo magnocelular (fig. 48) es positivo no distinguiéndose por marcaje del neuropilo, aunque se observa un contraste de marcaje en determinadas áreas (fig. 48a). El quiasma óptico reduce su marcaje fuertemente, observándose de tipo puntual poniendo de manifiesto los nodos de Ranvier. El epéndimo es negativo. Se marca intensamente la limitante interna, con un marcaje en forma de lámina en la zona basal de los endimocitos. También se observa un incremento de marcaje en la zona periventricular. Se observa marcaje en la periferia de los vasos formando una delgadísima capa.

Estadio M1:

El marcaje es similar al del estadio P21 con descenso generalizado de marcaje del neuropilo. En el núcleo paraventricular (fig. 44) el descenso de tinción es patente. Y se conserva el marcaje intenso sólo en determinadas zonas de la superficie del soma de las neuronas (fig. 44a). El quiasma óptico baja todavía más su marcaje, sin embargo se observan unas estructuras de formas cruciformes o puntiformes que se relacionan con los nodos de Ranvier. El núcleo magnocelular preóptico aparece con marcaje algo

mayor acumulándose en determinadas neuronas algo más, insinuándose unas redes perineuronales difusas.

Estadio M3:

Disminuye el marcaje del neuropilo. El núcleo supraóptico es positivo y destaca sobre el neuropilo. En su parte ventral está más marcado y se continúa con la capa molecular de corteza piriforme. El núcleo paraventricular es similar a M1. El núcleo magnocelular preóptico (fig. 47) aumenta su marcaje por encima de la tinción del neuropilo, detectándose en algunas neuronas redes perineuronales de tipo clásico, que sólo tiñe la parte de soma y prolongaciones proximales (figs. 47a y 47b). El quiasma óptico igual que en el estadio M1. El epéndimo es negativo. Pero al igual que en M1 y P21 se marca la zona limitante interna y la zona periventricular. Así como también el marcaje perivascular citado en P21.

Estadio A1 y A2:

El núcleo supraóptico (figs. 41 y 42) está bien marcado destacando ante el neuropilo que no tiene o posee escasa tinción. Con mayor marcaje en su parte ventral, la cual esta última se continúa con la tinción de la capa molecular de corteza piriforme también intensamente inmunomarcada. Se observa una bajada generalizada de marcaje en el núcleo (fig. 41). Sin embargo, el marcaje se mantiene en determinadas zonas de las neuronas (figs. 41a y 42) confiriéndole una marcada polaridad. El núcleo paraventricular (fig. 45) bien marcado, destaca la parte magnocelular. El marcaje, aunque disminuido, no parece que se acumule en la superficie celular de las neuronas, sino más bien entre las prolongaciones que rodean a ésta (fig. 45a). El núcleo magnocelular preóptico es positivo (fig. 46), denota un aumento de marcaje que destaca

notablemente del marcaje en el neuropilo. Se ven algunas células de este núcleo con redes perineuronales de tipo clásico, como se demuestra en el contorno tan definido de la malla (figs. 46a y 46b). El quiasma óptico está menos marcado que el neuropilo, presenta marcaje en los nodos de Ranvier. El epéndimo no está marcado, pero sí la membrana limitante interna en su parte basal así como toda el área periventricular. Se mantiene el marcaje perivascular.

Se detecta una bajada de marcaje en el neuropilo, que se acentúa con la edad. En los núcleos supraóptico y paraventricular decrece el marcaje al igual que en el neuropilo pero a partir del día 21 en el supraóptico y desde el año 1 en el paraventricular, el marcaje permanece constante y se mantiene. En el núcleo magnocelular preóptico se definen redes perineuronales de tipo clásico en forma de red a partir del primer mes de vida del animal, que se mantendrán en el tiempo. Cabe destacar el epéndimo totalmente negativo para este compuesto durante todo el tiempo, mientras que el límite del epéndimo se marca de forma constante a partir del día 14, al igual que la periferia de los vasos sanguíneos.

Tabla de resultados con anticuerpos contra condroitín 6-sulfato proteoglucano

C6SPG	NSO	NPV	NMPO	Epéndimo	Lim Epénd	QO	Neuropilo
Estadio P1	+++	+++	++	-	-	+	++++
Estadio P7	++	++	+	-	+/-	+	+++
Estad. P14	+	+	+	-	+	+	+++
Estad. P21	++	+	+	-	+	+/-	++
Estadio M1	++	+	+ RP _C	-	+	-/+	+
Estadio M3	++	+	+ RP _C	-	+	-/+	+/-
Estadio A1	++	++	+ RP _C	-	+	-/+	-/+
Estadio A2	++	++	+ RP _C	-	+	-/+	-/+

Leyenda de siglas:

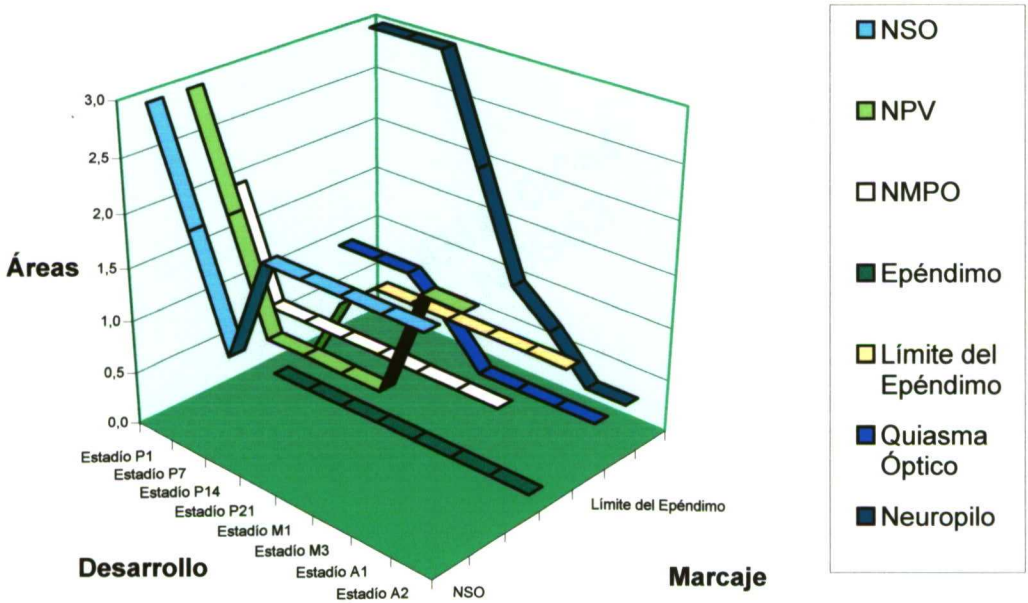
- C6SPG: Condroitín 6-sulfato proteoglucano
- NSO: Núcleo supraóptico
- NPV: Núcleo paraventricular
- NMPO: Núcleo magnocelular preóptico
- Epéndimo: Ependimocitos
- Lim Epéndimo: Limitante interna ependimaria
- QO: Quiasma óptico
- Neuropilo: Matriz extracelular marcada donde no hay núcleos

- RP_C: Redes perineuronales de tipo clásico, con forma de red

Leyenda de signos:

- marcate nulo
- /+ sin marcate salvo en pequeñas zonas
- +/- marcate positivo en su mayoría, con zonas negativas
- + marcate positivo
- ++ marcate positivo intenso
- +++ marcate positivo fuerte
- ++++ marcate positivo muy fuerte

Gráfico del proteoglucano condroitín 6-sulfato



Inmunodetección de condroitín 6-sulfato proteoglucano

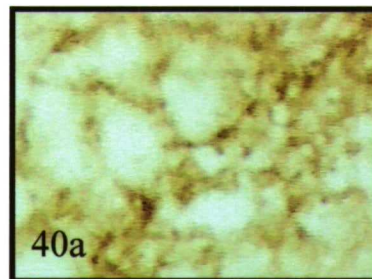
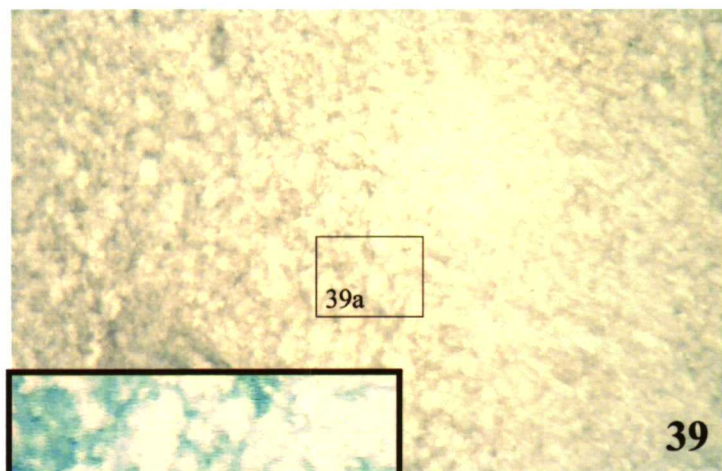


Figura 39. Panorámica del núcleo supraóptico donde denota gran cantidad de marcaje en todo el tejido (figura 39a) en este estadio tan temprano. Estadío P1. Figura 39: 880x; y figura 39a: 2.900x.

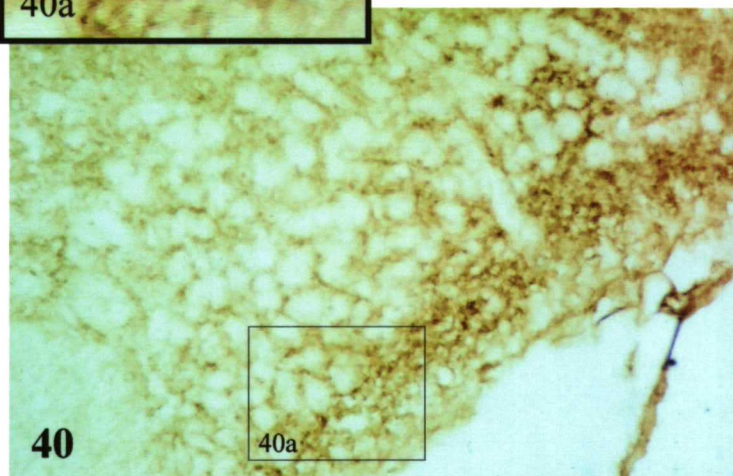


Figura 40. Panorámica del núcleo supraóptico donde podemos observar disminución de marcaje generalizado, y cómo en el quiasma óptico ya casi no existe. Mientras se mantiene mucha matriz extracelular en una zona de gran plasticidad, como es la zona de las dendritas. Estadío P21. Figura 40: 1.100x; y figura 40a: 2.700x.

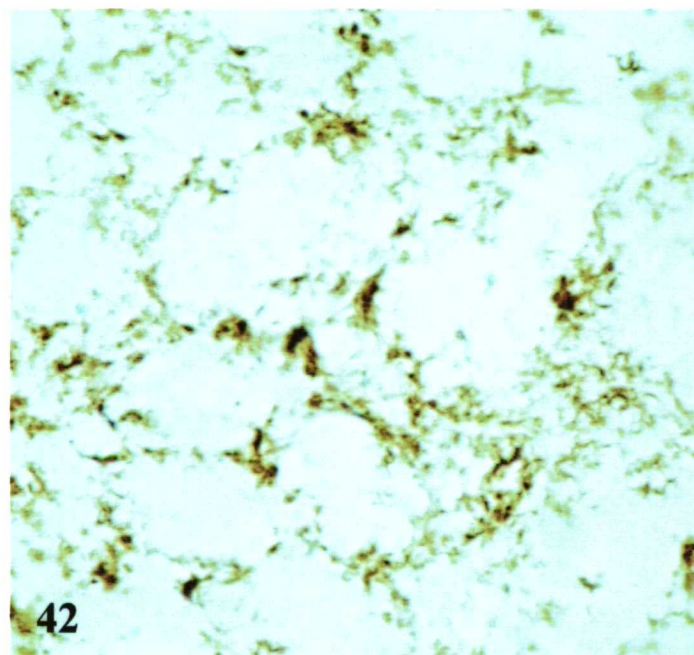
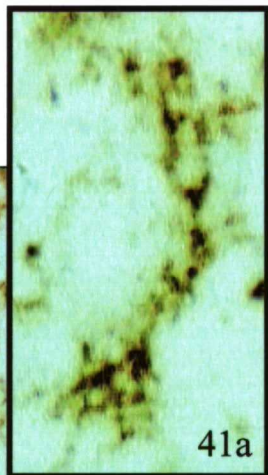
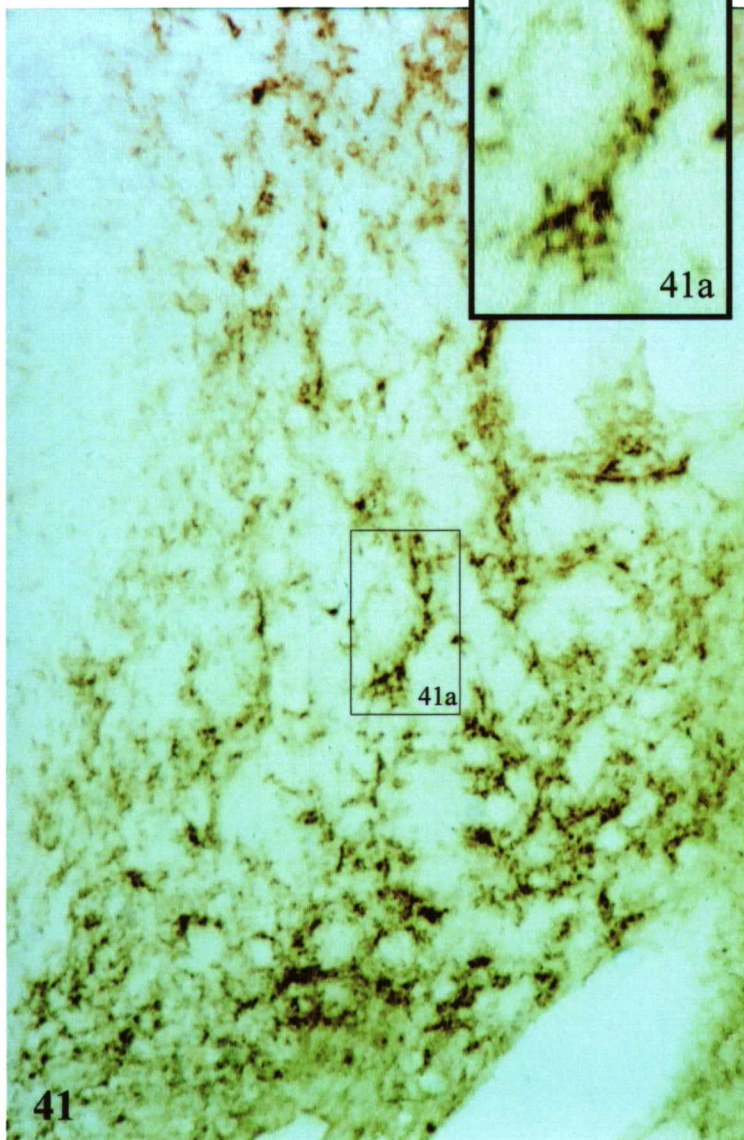


Figura 41. Detalle del núcleo supraóptico. El marcaje es mucho más limitado en el espacio y se acumula en determinados lugares alrededor de las neuronas (figura 41a). Estadío A2. Figura 41: 2.300x; y figura 41a: 5.000x.

Figura 42. Detalle del núcleo supraóptico en la que se puede observar la disminución general de marcaje respecto a estadios más tempranos. Estadío A2. 1.400x.

Inmunodetección de condroitín 6-sulfato proteoglicano

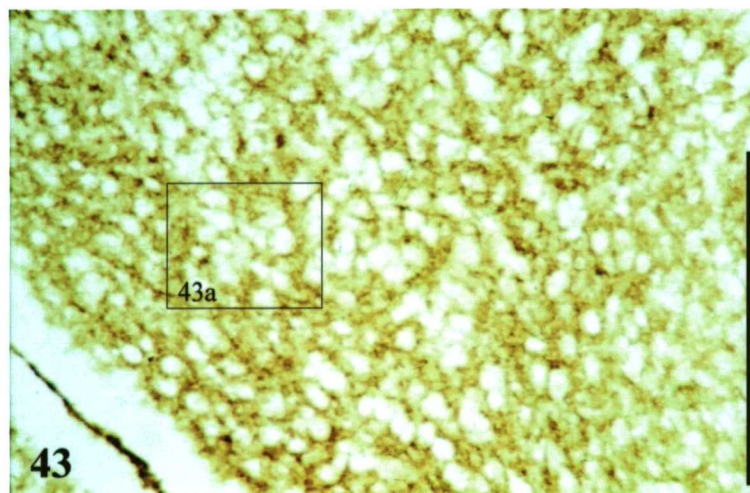


Figura 43. Panorámica del núcleo paraventricular en donde se puede apreciar gran cantidad de marcaje en la periferia de las neuronas. La matriz extracelular está intensamente marcada por este anticuerpo. Se observa in-

munorreactividad negativa para los endopodocitos. En este estadio tan temprano, se puede observar que alrededor de las neuronas se acumula marcaje en unas zonas más que en otras (figura 43a). Estadío P1. Figura 43: 1.100x; y figura 43a: 3.600x.

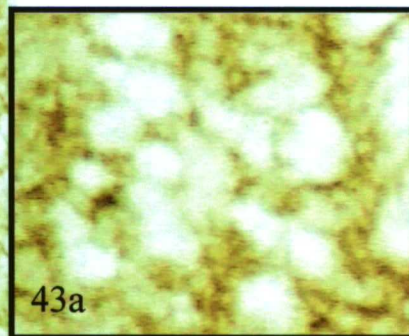


Figura 44. Detalle del núcleo paraventricular donde se aprecia el contorno de las neuronas. Se observa acumulación de marcaje en determinadas zonas dando aspecto granular. (Figura 44a). Estadío M1. Figura 44: 1.700x; y figura 44a: 3.400x.

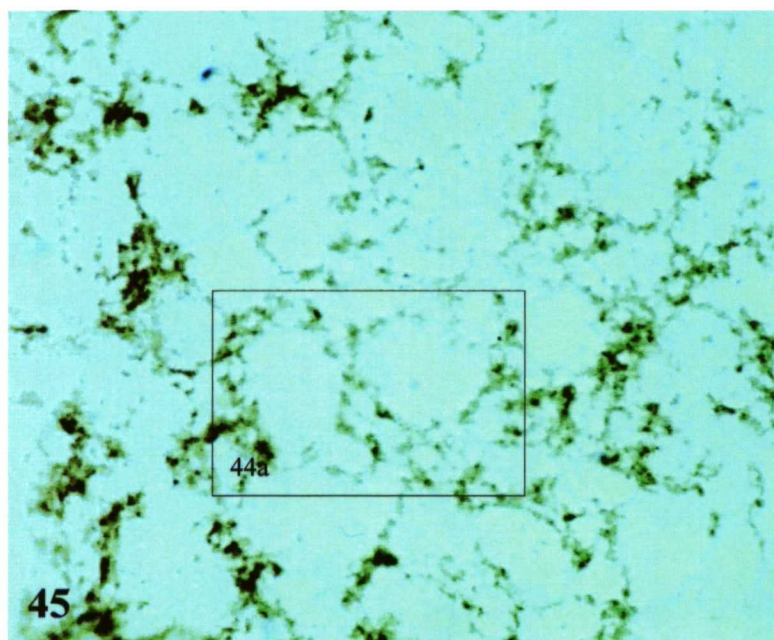
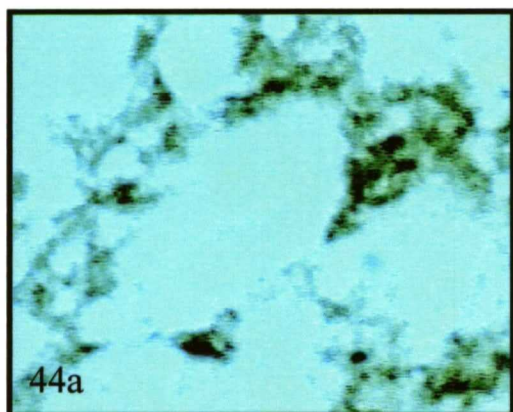
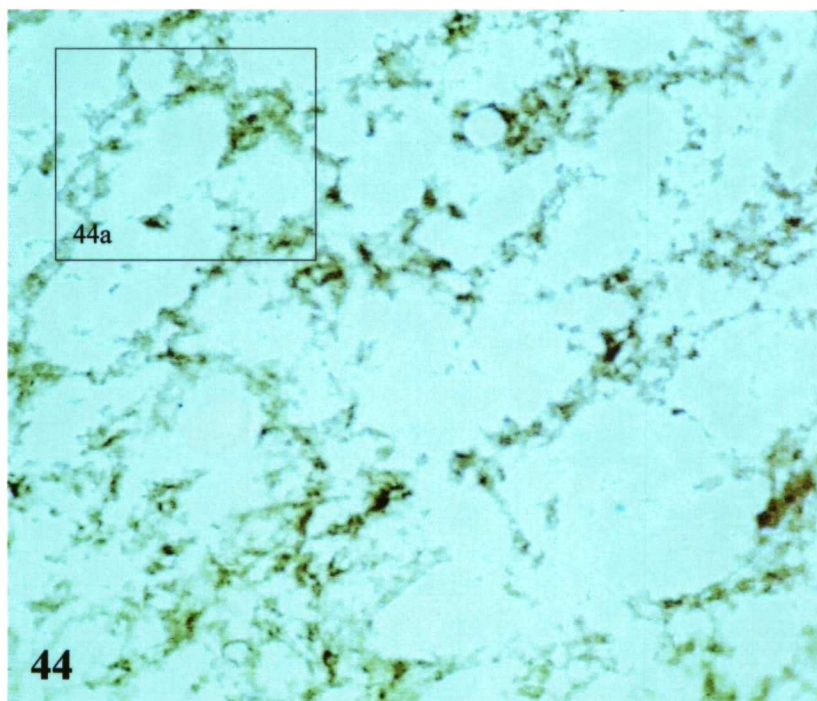
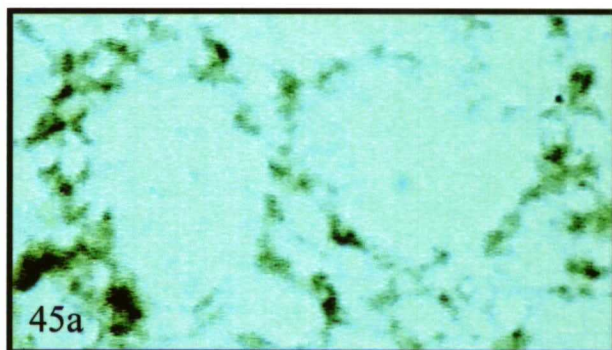


Figura 45. Detalle del núcleo paraventricular. Se observan dos neuronas delimitadas por el marcaje (figura 45a). Existe concentración de matriz extracelular en determinados sitios distribuidos no homogéneamente en el sistema nervioso. En este estadio tan avanzado, se puede apreciar una bajada generalizada de cantidad de marcaje con la edad. De forma que el marcaje se conserva en algunas zonas y en otras se pierde con la edad. Estadío A1. Figura 45: 1.500x; y figura 45a: 3.100x.



Inmunodetección de condroitín 6-sulfato proteoglucano

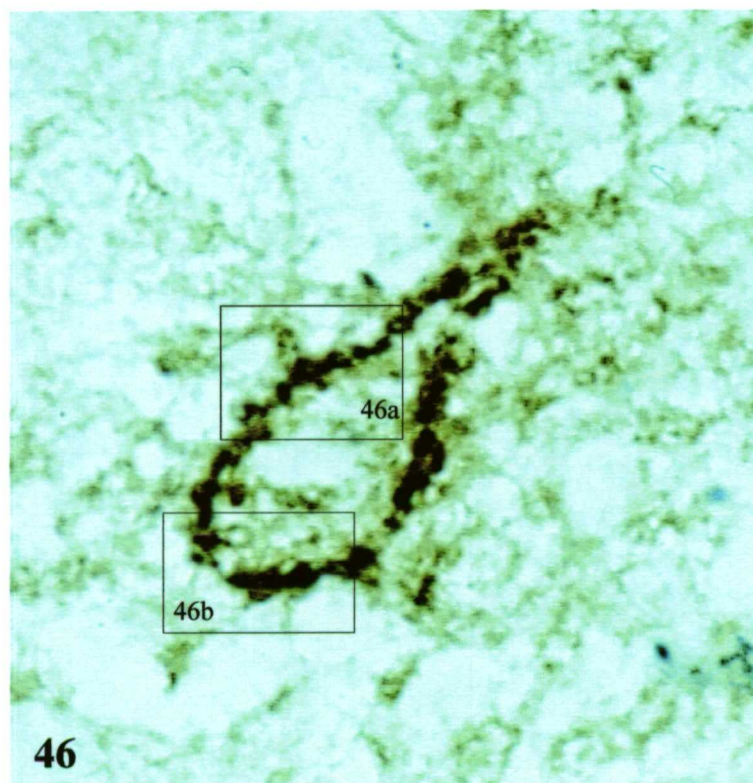


Figura 46. Detalle de una neurona del núcleo magnocelular preóptico. Aparece un fuerte marcaje unido a la superficie de algunas neuronas. En estas imágenes se pueden observar el retículo del borde la célula (figura 46a) así como la matriz extracelular acumulada alrededor de una posible sinapsis (figura 46b). Estadío A2. Figura 46: 2.700x; figura 46a: 4.100x; y figura 46b: 4.800x.

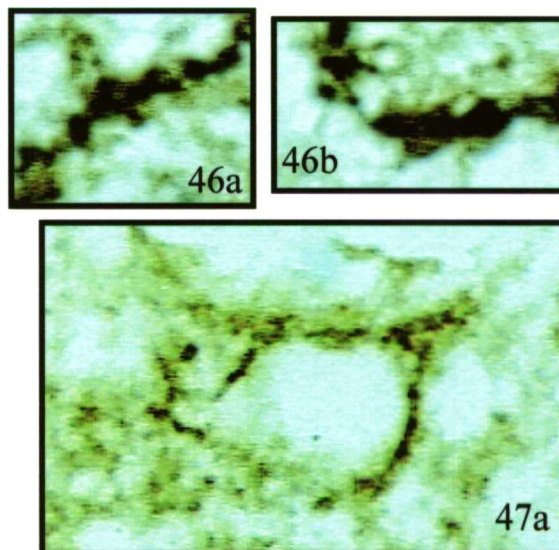


Figura 47. Panorámica del núcleo magnocelular preóptico en el que se observan varias neuronas bien marcadas en su superficie (figuras 47a, b). Estadío M3. Figura 47: 1.600x; figura 47a: 4.600x; y figura 47b: 3.700x.

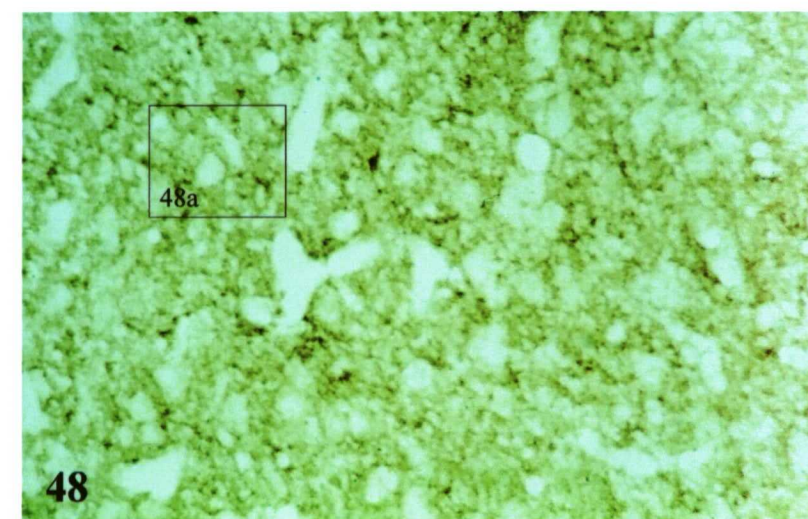
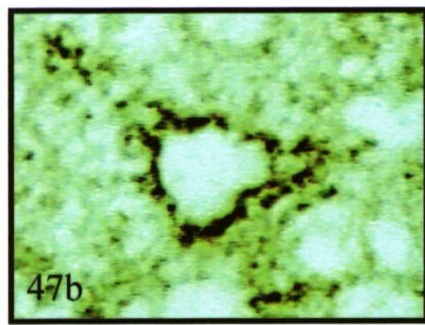
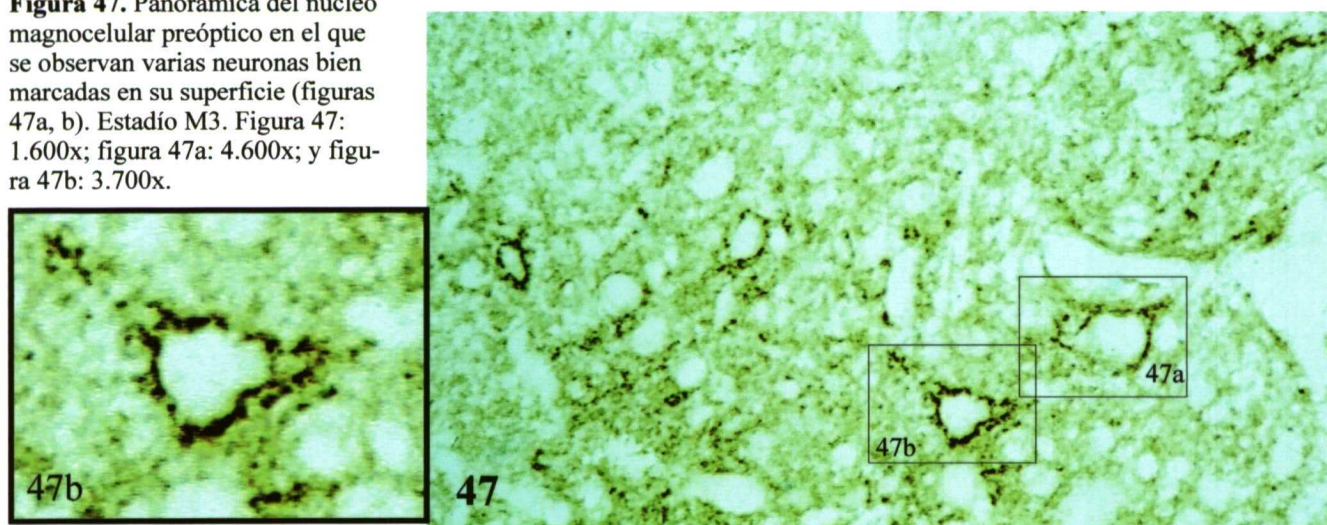
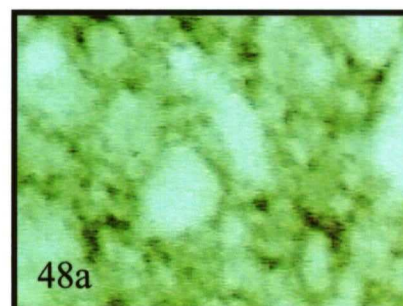


Figura 48. Panorámica del núcleo magnocelular preóptico. Se puede apreciar la gran cantidad de marcaje que se detecta en estadíos tan tempranos. En el detalle (figura 48a) las neuronas no poseen el típico marcaje de superficie celular llamado redes perineuronales. Estadío P21. Figura 48: 1.200x; y figura 48a: 3.000x.

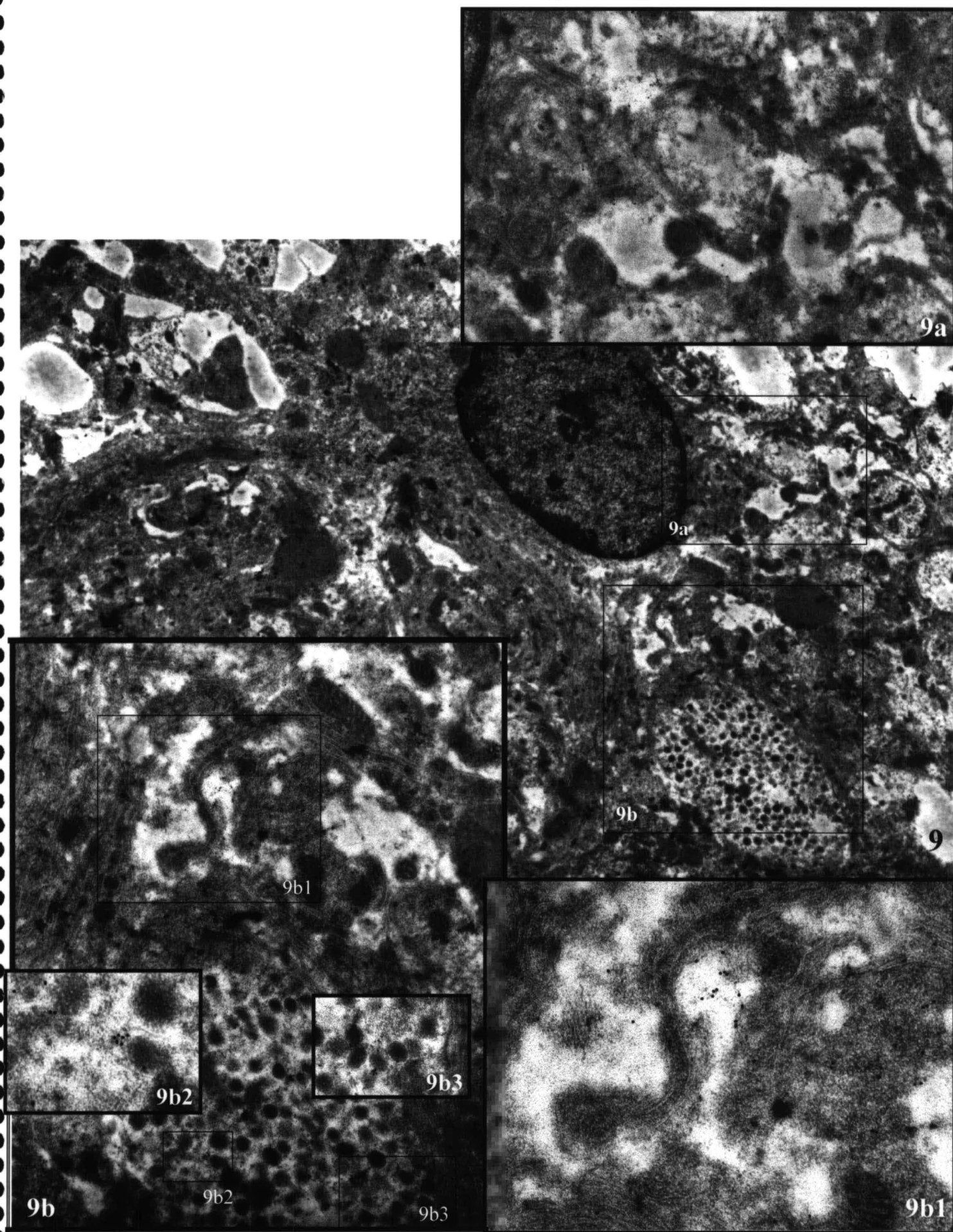


Inmunolocalización y detección a microscopía electrónica del proteoglucano condroitín 6 sulfato

El marcaje obtenido es disperso. Se acumula sobre todo en astrocitos, aunque también aparece gran cantidad de marcaje en algunas vesículas de secreción de axones neuronales. En los astrocitos se observa marcaje en el retículo endoplásmico rugoso. Aparece especialmente abundante en prolongaciones y en los gliofilamentos. En neuronas aparece poco marcaje en dendritas y mucho más marcaje en los axones. Concentrándose en determinadas vesículas de secreción sobre la parte de membrana que da la cara al citoplasma. En la matriz extracelular, el marcaje es disperso y se sitúa muy relacionado con la membrana plasmática. Sobre todo situado en la superficie membranosa de las prolongaciones de astrocitos y también de dendritas. Cabe destacar que no todas las prolongaciones de astrocitos poseen un marcaje tan acusado, ni todas las dendritas de las neuronas tanta cantidad. Aparece el marcaje más bien en áreas determinadas de forma más concentrado.

Figura 9: Panorámica de una sección transversal de un soma astrocitario. Se aprecia marcaje en el citoplasma astrocitario en vesículas (fig. 9a) y también alrededor de dendritas (fig 9a). También aparece marcaje en matriz extracelular (fig. 9b1) y en la superficie de prolongaciones del astrocito. Se puede localizar marcaje asimismo en el interior de los axones donde encontramos marcadas vesículas de secreción (fig. 9b2 y fig. 9b3) de forma puntual y concentrada en determinadas vesículas, no en todas. Figura 9: 7.000x; figura 9a: 12.000x; figura 9b: 22.000x; figura 9b1: 47.500x; figura 9b2: 58.500x; y figura 9b3: 29.300x.

Inmunodetección de condroitín 6-sulfato proteoglicano con oro coloidal



8.- Distribución y localización del queratán sulfato proteoglucano

Estadio P1:

Existe marcaje generalizado y no homogéneo del neuropilo. El núcleo supraóptico (fig. 49) es positivo, mayor que el neuropilo. El quiasma óptico (fig. 49) en sus extremos es negativo y positivo en la zona medial. El núcleo paraventricular es positivo con igual intensidad que el neuropilo, no destaca sobre él. El núcleo magnocelular preóptico es positivo pero no destaca del marcaje que tiene el neuropilo. Existe un leve marcaje perivascular. El epéndimo es positivo.

Estadio P7:

El marcaje es similar al de P1. El núcleo supraóptico disminuye de marcaje.

Estadio P14:

El núcleo supraóptico aparece con menos marcaje. El quiasma óptico en su área lateral también negativo, sin embargo, en la zona central es positivo. El núcleo paraventricular es débilmente marcado con igual intensidad que el neuropilo. El núcleo magnocelular preóptico no destaca sobre el neuropilo. El quiasma óptico en el área lateral es negativo, al contrario que en el área medial que aparece como positivo. El epéndimo es positivo. Se marca positiva la capa limitante interna.

Estadio P21:

El núcleo supraóptico (fig. 50) aparece marcado, pero no destaca demasiado de la tinción del neuropilo. Se observa que el marcaje que rodea a las neuronas se sitúa de forma asimétrica o polarizada. El núcleo paraventricular (fig. 53) aparece marcado pero

sin destacar del marcaje general del neuropilo (fig. 53a). El núcleo magnocelular preóptico no destaca del neuropilo. El núcleo reticular talámico aparece algo más marcado. El quiasma óptico aparece marcado, intuyéndose los nodos de Ranvier. El epéndimo es positivo, además es positivo también la membrana limitante interna. Se observa un ligero marcaje en la capa molecular de corteza piriforme.

Estadio M1:

El marcaje es muy similar al estadio P21. La zona periventricular incrementa su marcaje.

Estadio M3:

El núcleo supraóptico (figs. 51 y 52) sigue teniendo un débil marcaje. Este marcaje es más débil que en estadios anteriores. Aparece marcaje que se sitúa irregularmente distribuido en la superficie de las neuronas. En general, el marcaje es igual que en el estadio M1.

Estadíos A1 y A2:

El marcaje es similar al del estadio M3, aunque con menor intensidad de marcaje. En el núcleo paraventricular (fig. 54), el marcaje se acumula en la periferia de las neuronas magnocelulares del mismo (fig. 54a), siendo escaso en las parvocelulares. Mientras que en el tejido circundante o neuropilo ha disminuido o desaparecido la inmunorreactividad. En el núcleo magnocelular preóptico (fig. 55), no se observan redes perineuronales típicas, sino un incremento escaso de matriz extracelular con respecto al neuropilo, en lo que podríamos llamar unas redes perineuronales de tipo difusas con escasa reacción.

En general, el marcaje en el neuropilo disminuye con el tiempo. Los núcleos hipotalámicos siguen esta tónica, sin embargo, el núcleo paraventricular y magnocelular preóptico tienen mayor marcaje que el neuropilo a partir del estadio M1. El epéndimo y su límite con el neuropilo, se mantiene constantemente bien marcado a lo largo del tiempo. También cabe destacar el marcaje constante de los nodos de Ranvier en el área del quiasma óptico.

Tabla de resultados con anticuerpos contra queratán sulfato proteoglucano

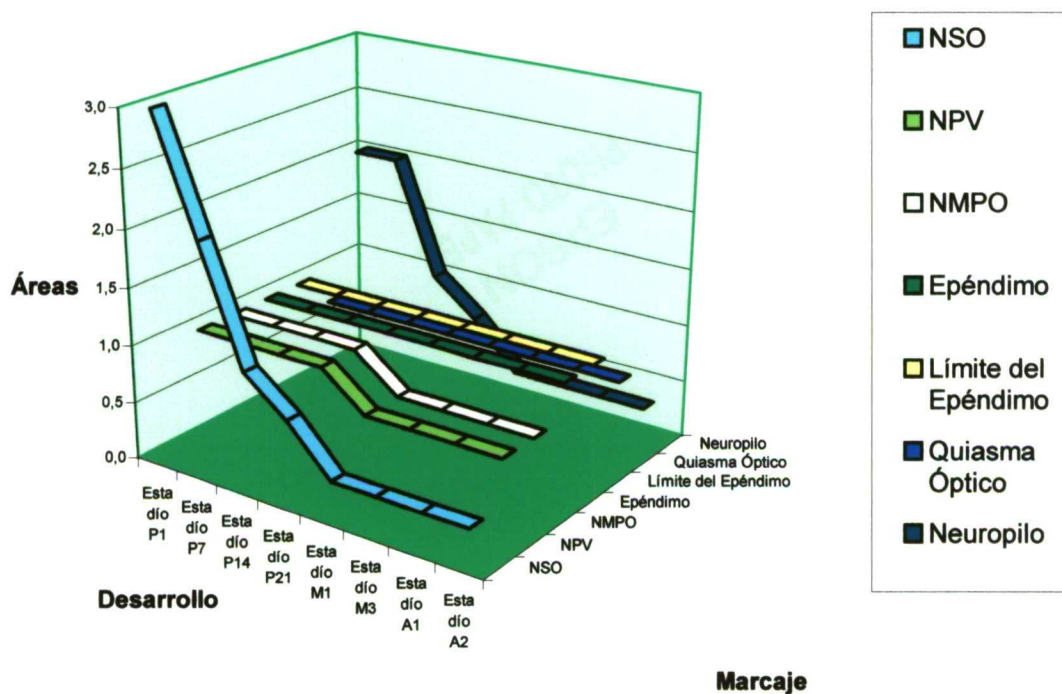
KSPG	NSO	NPV	NMPO	Epéndimo	Lim Epénd	QO	Neuropilo
Estadio P1	++++	+	+	+	+	+/-	++
Estadio P7	++	+	+	+	+	+/-	++
Estad. P14	+	+	+	+	+	+/-	+
Estad. P21	+/-	+	+	+	+	+/-	+/-
Estadio M1	-/+	+/-	+/-	+	+	+/-	-/+
Estadio M3	-/+	+/-	+/-	+	+	+/-	-/+
Estadio A1	-/+	+/-	+/-	+	+	+/-	-/+
Estadio A2	-/+	+/-	+/-	+	+	+/-	-/+

Leyenda de siglas:

- KSPG: Queratán sulfato proteoglucano
- NSO: Núcleo supraóptico
- NPV: Núcleo paraventricular
- NMPO: Núcleo magnocelular preóptico
- Epéndimo: Ependimocitos
- Lim Epéndimo: Limitante interna endimaria
- QO: Quiasma óptico
- Cort Pir: Corteza piriforme
- Neuropilo: Matriz extracelular marcada donde no hay núcleos
- RP: Redes perineuronales

Leyenda de signos:

- marcaje nulo
- /+ sin marcaje salvo en pequeñas zonas
- +/- marcaje positivo en su mayoría, con zonas negativas
- +
- ++ marcaje positivo intenso
- +++ marcaje positivo fuerte
- ++++ marcaje positivo muy fuerte

Gráfico del proteoglucano queratán sulfato

Inmunodetección de queratán sulfato proteoglucano

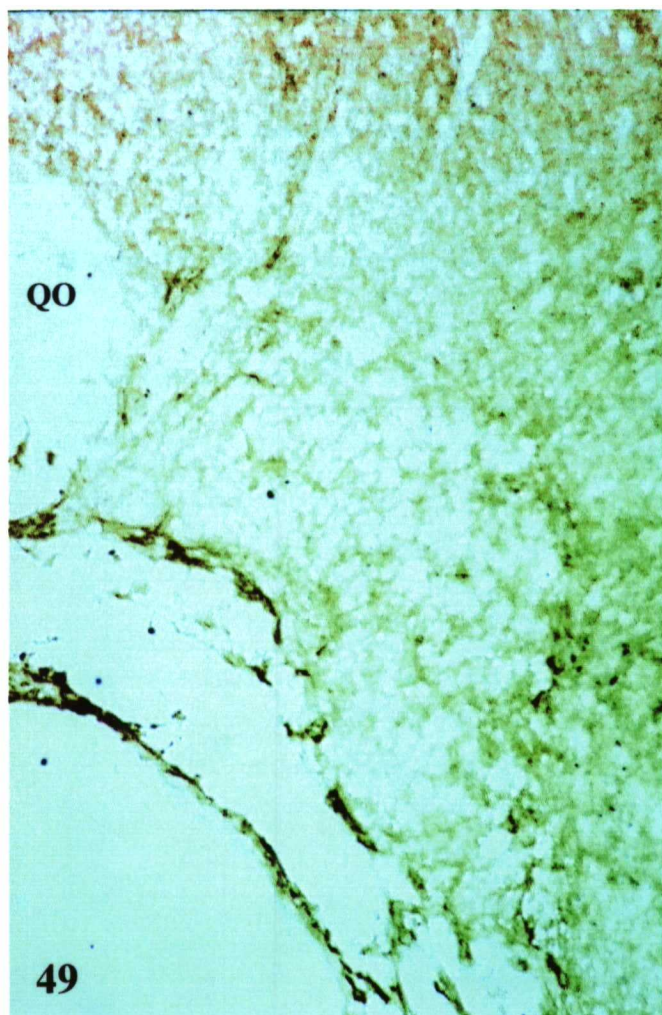


Figura 49. Vista general del núcleo supraóptico donde se observa mayor marcaje en la periferia del núcleo y el quiasma óptico (QO) está muy poco teñido. Estadío P1. 830x.

Figura 50. Detalle del núcleo supraóptico. Las neuronas se observan teñidas en su superficie, acumulándose la tinción en zonas determinadas (figura 50a). Estadío P21. Figura 50: 2.200x; y figura 50a: 5.000x.

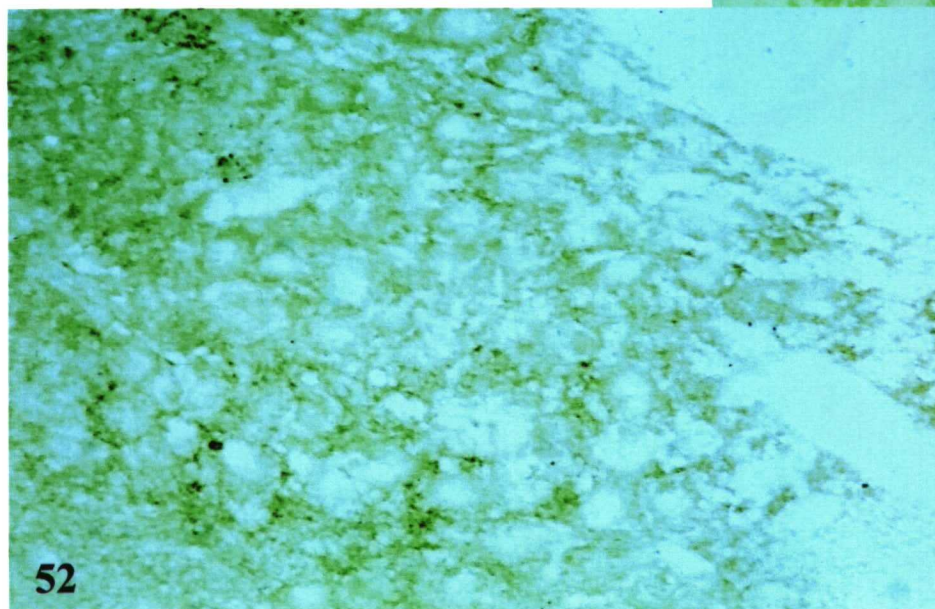
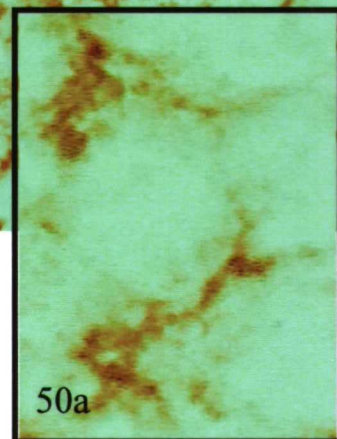
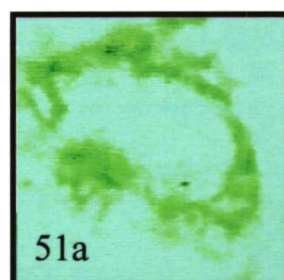
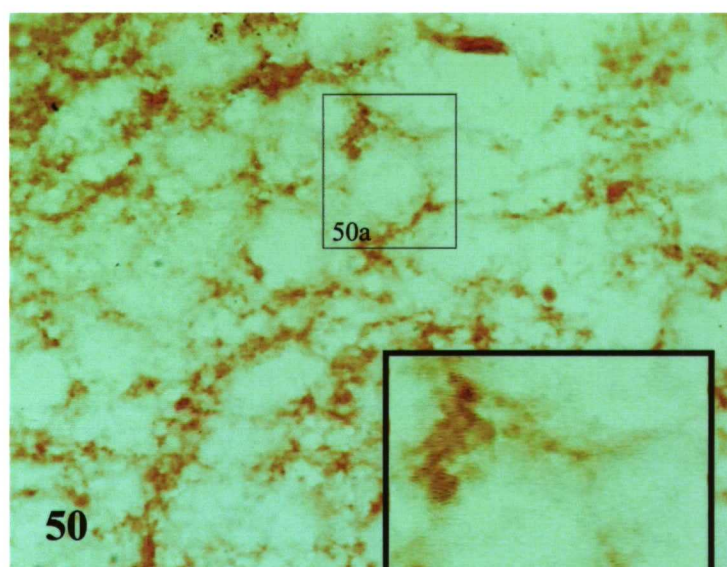


Figura 51. Detalle del núcleo supraóptico. El marcaje respecto a estadíos anteriores empieza a disminuir, sin embargo queda la característica acumulación desigual de queratán sulfato proteoglucano sobre la superficie de la neurona (figura 51a). Estadío M3. Figura 51: 2.000; y figura 51a: 4.300x.

Figura 52. Vista panorámica del núcleo supraóptico. En él también se aprecia la disminución de marcaje progresiva con la edad. Estadío M3. 1.300x.

Inmunodetección de queratán sulfato proteoglucano

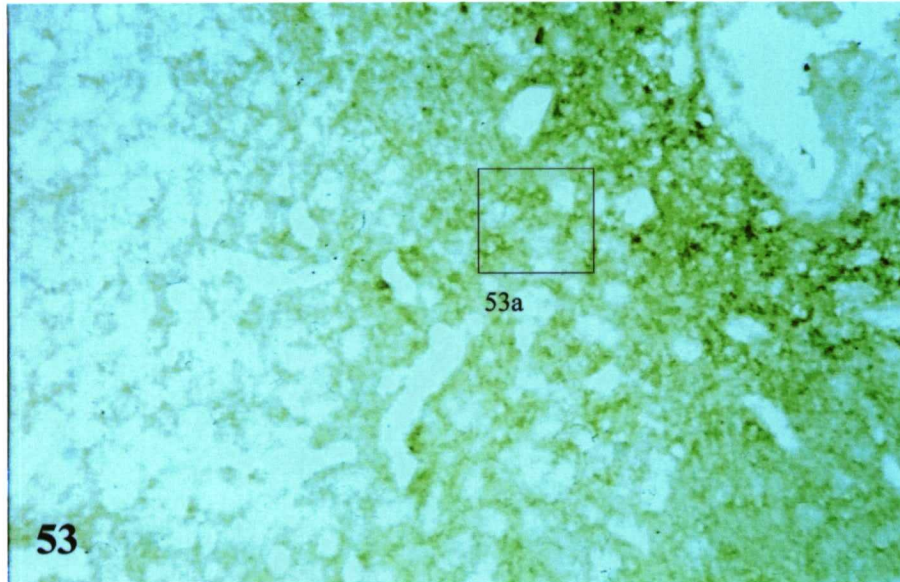


Figura 53. Panorámica del núcleo paraventricular. Se puede observar gran cantidad de marcaje rodeando a la parte magnocelular de dicho núcleo. El marcaje se acumula en la periferia de la neurona, entre las prolongaciones que están situadas entre los somas (figura 53a). Estadío P21. Figura 53: 930x; y figura 53a: 2.540x.

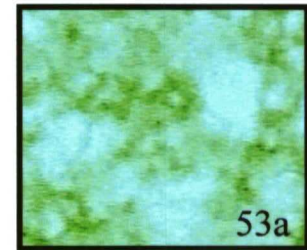


Figura 54. Panorámica del núcleo paraventricular. Se observa marcaje conservado en la parte central del núcleo, donde se sitúan las neuronas magnocelulares. En el resto del tejido de las áreas de alrededor el marcaje es muy escaso o no existe. Rodeando a las neuronas existen zonas de marcaje más intenso (figura 54a). Estadío A2. Figura 54: 1.330x; y figura 54a: 3.400x.

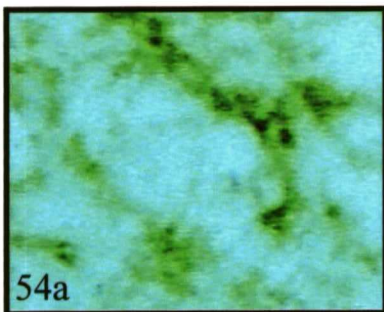
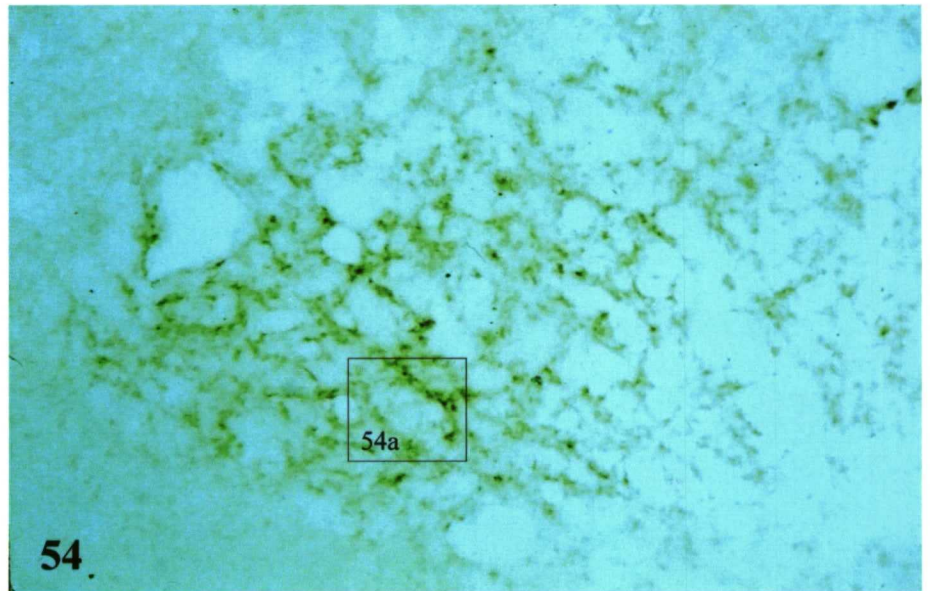
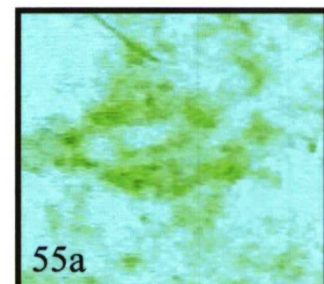
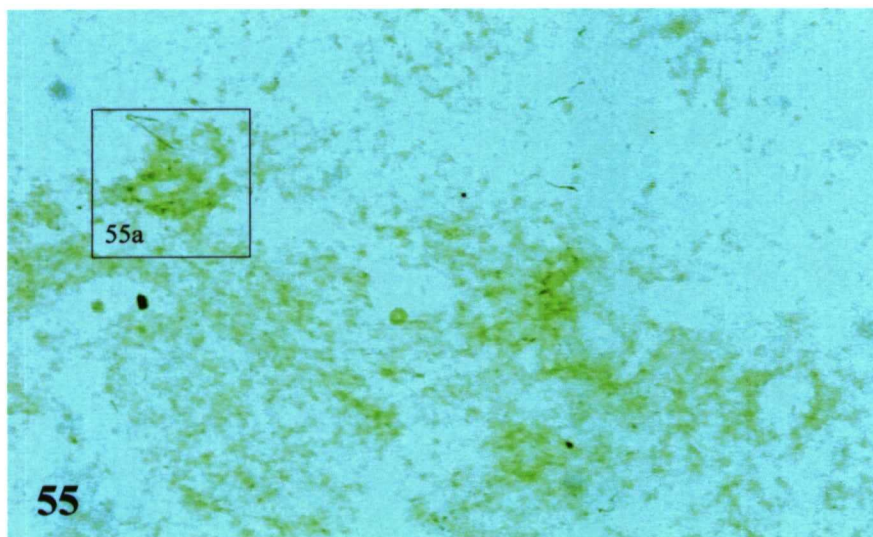


Figura 55. Detalle del núcleo magnocelular preóptico. Se observan algunas neuronas con gran cantidad de matriz extracelular en la superficie de la membrana del soma celular (figura 55a). No se detectan las típicas imágenes de las redes perineuronales de tipo clásico. Estadío A2. Figura 55: 1.100x; y figura 55a: 1.740x.



8.- Distribución y localización de tenascina

Estadio P1:

En el núcleo supraóptico se marcan diferentes las células. Con el núcleo paraventricular pasa igual. El núcleo magnocelular preóptico no destaca del marcaje general. El quiasma óptico es suavemente marcado al igual que el neuropilo. El epéndimo es negativo.

Estadio P7:

El núcleo supraóptico es positivo que se incrementa en su zona inferior o ventral. Destaca sobre el marcaje que se da en el neuropilo. En núcleo paraventricular es positivo pero con igual tono que el neuropilo. El núcleo magnocelular preóptico no destaca del neuropilo. El quiasma óptico es positivo, aumentando su marcaje en su parte inferior y medial y paramedial. Se observan algunas células internamente teñidas en la parte dorsal del núcleo supraóptico, quiasma óptico y ventrículo, incluida la zona inferior o periventricular.

Estadio P14:

El núcleo supraóptico (fig. 56) es positivo al igual que en el estadio P7. Se observan las neuronas marcadas, así como parte de sus prolongaciones, mientras que los astrocitos aparecen más intensamente marcados. El núcleo paraventricular no destaca del marcaje general del núcleo magnocelular igual que en el estadio P7. El quiasma óptico es positivo de igual manera que en el estadio P7. La zona periventricular es positiva así como la limitante interna y externa. El quiasma óptico es positivo destacando no sólo los nodos de Ranvier, sino también los somas gliales que hay en él.

8.- Distribución y localización de tenascina

Estadio P1:

En el núcleo supraóptico se marcan diferentes las células. Con el núcleo paraventricular pasa igual. El núcleo magnocelular preóptico no destaca del marcaje general. El quiasma óptico es suavemente marcado al igual que el neuropilo. El epéndimo es negativo.

Estadio P7:

El núcleo supraóptico es positivo que se incrementa en su zona inferior o ventral. Destaca sobre el marcaje que se da en el neuropilo. En núcleo paraventricular es positivo pero con igual tono que el neuropilo. El núcleo magnocelular preóptico no destaca del neuropilo. El quiasma óptico es positivo, aumentando su marcaje en su parte inferior y medial y paramedial. Se observan algunas células internamente teñidas en la parte dorsal del núcleo supraóptico, quiasma óptico y ventrículo, incluida la zona inferior o periventricular.

Estadio P14:

El núcleo supraóptico (fig. 56) es positivo al igual que en el estadio P7. Se observan las neuronas marcadas, así como parte de sus prolongaciones, mientras que los astrocitos aparecen más intensamente marcados. El núcleo paraventricular no destaca del marcaje general del núcleo magnocelular igual que en el estadio P7. El quiasma óptico es positivo de igual manera que en el estadio P7. La zona periventricular es positiva así como la limitante interna y externa. El quiasma óptico es positivo destacando no sólo los nodos de Ranvier, sino también los somas gliales que hay en él.

Ligero marcaje perivascular. El epéndimo es positivo. Las células intensamente teñidas (astrocitos) que aparecían en el estadio P7 ahora en el estadio P14 son mucho más intensos y numerosos en el hipotálamo.

Estadio P21:

Disminución generalizada de marcaje en neuropilo. Las neuronas del núcleo supraóptico y núcleo paraventricular (fig. 61) aparecen marcadas sobre todo las del núcleo supraóptico. Ya que en el núcleo paraventricular hay neuronas marcadas muy intensamente comparándolas con el resto de las que componen el núcleo. Se marca intensamente la parte de limitante externa y también la limitante interna. El núcleo magnocelular preóptico no destaca su marcaje del resto de marcaje del neuropilo. Los astrocitos marcan su soma y se distribuyen homogéneamente por el neuropilo, con disposición especial en la limitante externa en el núcleo supraóptico y en la limitante interna en la zona periventricular.

Estadio M1:

Estadio caracterizado por la bajada generalizada de marcaje en el neuropilo. El núcleo supraóptico conserva su fuerte marcaje en las neuronas que lo componen (fig. 57). La parte ventral del núcleo supraóptico (fig. 58) aparece con menor marcaje, igual al del neuropilo. Siguen apareciendo gran cantidad de células muy marcadas por todo el neuropilo nervioso que se corresponden con astrocitos (fig. 58). Estas células gliales están más marcadas que las neuronas. Existe mayor acumulación de estas células en las proximidades de la limitante externa y también en la limitante interna. Constituyendo esta última un marcaje periventricular muy patente. Las neuronas del núcleo paraventricular están marcadas pero menos que en el núcleo supraóptico, teniendo el

mismo tono de marcaje que el neuropilo. El núcleo magnocelular preóptico no destaca del marcaje del neuropilo. El marcaje general detectado en el quiasma óptico es menor que en el neuropilo en su zona más lateral, mientras que en la zonas medial sigue teniendo buen marcaje. En la zona con menor marcaje del quiasma óptico destaca el marcaje de células que parecen corresponder con astrocitos y más débilmente con oligodendrocitos. Aparecen marcados los nodos de Ranvier de forma patente. También aparece marcaje en forma de una delgada lámina en la periferia de los vasos sanguíneos. El epéndimo es positivo.

Estadio M3:

El núcleo supraóptico aparece bien marcado en sus células destacando sobre el neuropilo. Se ven algunos somas de células pequeñas marcadas intensamente que por su morfología recuerdan astrocitos. Se marca bien la limitante externa. El núcleo paraventricular tiene un menor marcaje que en el núcleo supraóptico, sin embargo, más que el neuropilo. En la zona periventricular aparecen bien marcados astrocitos o células gliales, incluida la zona más medial del núcleo supraóptico. Las neuronas del núcleo magnocelular preóptico están poco marcadas confundándose con el marcaje del neuropilo. El quiasma óptico aparece muy poco teñido, sólo destacando algunas células gliales con el soma teñido, así como algunos nodos de Ranvier. La periferia de los vasos continúa estando marcada.

Estadio A1 y A2:

El marcaje obtenido para los estadios A1 y A2 para tenascina es muy parecido al que se obtiene en el estadio de M3. En el núcleo supraóptico (fig. 59) se puede observar el marcaje de las neuronas, sobre todo su soma (figs. 59a y 60) y también sus dendritas

(fig. 60a), así como el de los astrocitos (fig 59b) en los que también se marcan además de el pericarion, sus prolongaciones. En el núcleo paraventricular, el marcaje obtenido es muy similar al del núcleo supraóptico. También se observa marcaje de tenascina en la superficie de los vasos sanguíneos, que mayor es cuanto más grande es el calibre de los vasos (fig. 59 y 62a) que parece estar relacionada con el marcaje de prolongaciones de astrocitos (fig. 62b). Asimismo se puede apreciar una disminución de marcaje generalizado de tenascina en las zonas colindantes del núcleo como en el quiasma óptico y el neuropilo dorsal al núcleo.

En general el marcaje de matriz extracelular con tenascina reflejado en el neuropilo disminuye con el tiempo. Destaca el aumento de marcaje registrado en las células del núcleo supraóptico, sobre todo a partir del día 21 postnatal. También aparece mucho marcaje en el núcleo paraventricular que se mantiene constante desde el día 21. Cabe destacar la fuerte inmunorreactividad del epéndimo y del límite del epéndimo desde el día 14. Además se observan marcados los nodos de Ranvier que aparecen más marcados entre los estadios 7 y 21. Es de notar la fuerte tinción de la capa molecular de la corteza piriforme que mantiene un marcaje constante en el tiempo.

Tabla de resultados con anticuerpos contra tenascina

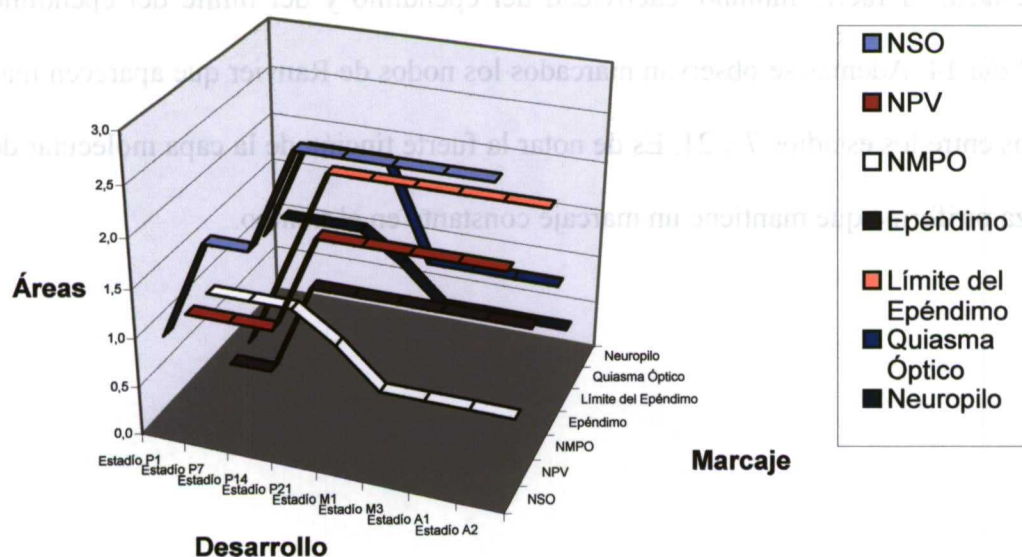
TEN	NSO	NPV	NMPO	Epéndimo	Lim Epénd	QO	Neuropilo
Estadio P1	+	+	+	-	-	+	+
Estadio P7	++	+	+	-	+	++	+
Estad. P14	++	+	+	+	++	++	+
Estad. P21	+++	++	+/-	+	++	++	+/-
Estadio M1	+++	++	-/+	+	++	+	-/+
Estadio M3	+++	++	-/+	+	++	+	-/+
Estadio A1	+++	++	-/+	+	++	+	-/+
Estadio A2	+++	++	-/+	+	++	+	-/+

Leyenda de siglas:

- TEN: Tenascina
- NPV: Núcleo paraventricular
- NMPO: Núcleo magnocelular preóptico
- Epéndimo: Ependimocitos
- Lim Epéndimo: Limitante interna ependimaria
- QO: Quiasma óptico
- Neuropilo: Matriz extracelular marcada donde no hay núcleos
- RP: Redes perineuronales

Leyenda de signos:

- marcaje nulo
- /+ sin marcaje salvo en pequeñas zonas
- +/- marcaje positivo en su mayoría, con zonas negativas
- +
- ++ marcaje positivo intenso
- +++ marcaje positivo fuerte
- ++++ marcaje positivo muy fuerte

Gráfico de tenascina

Inmunodetección de tenascina

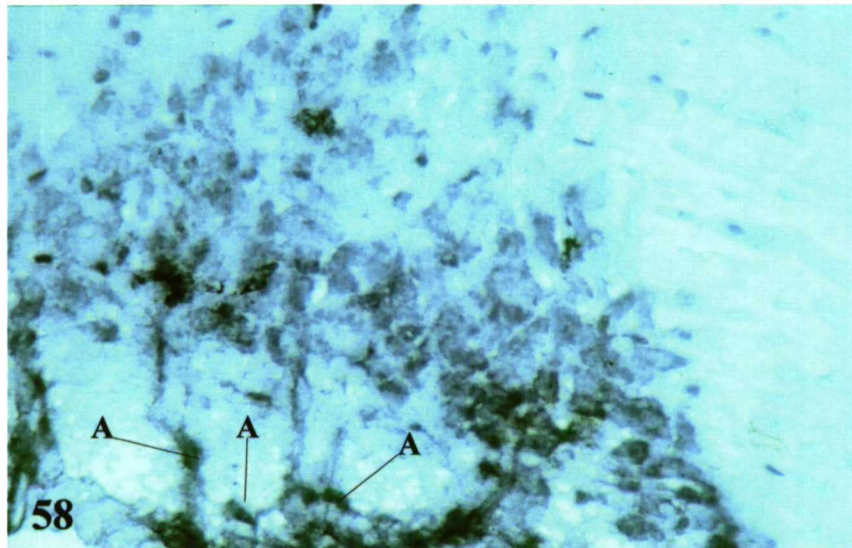
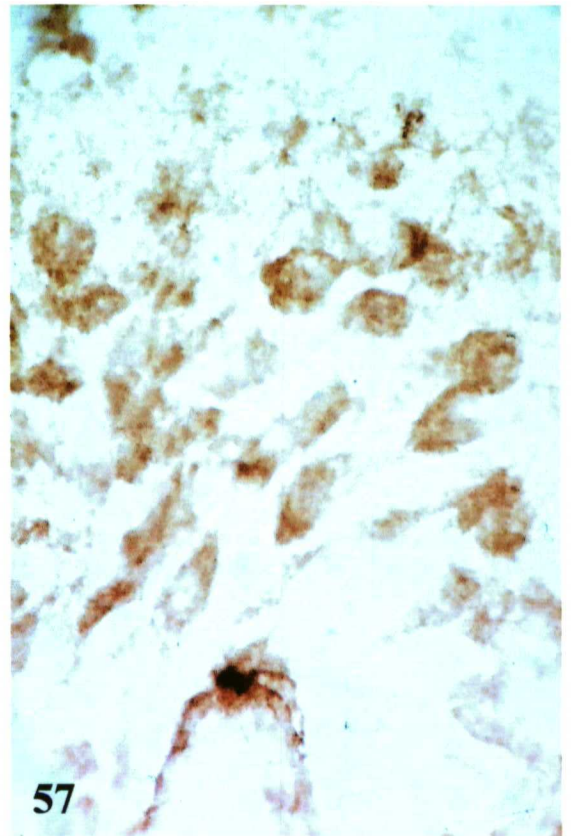
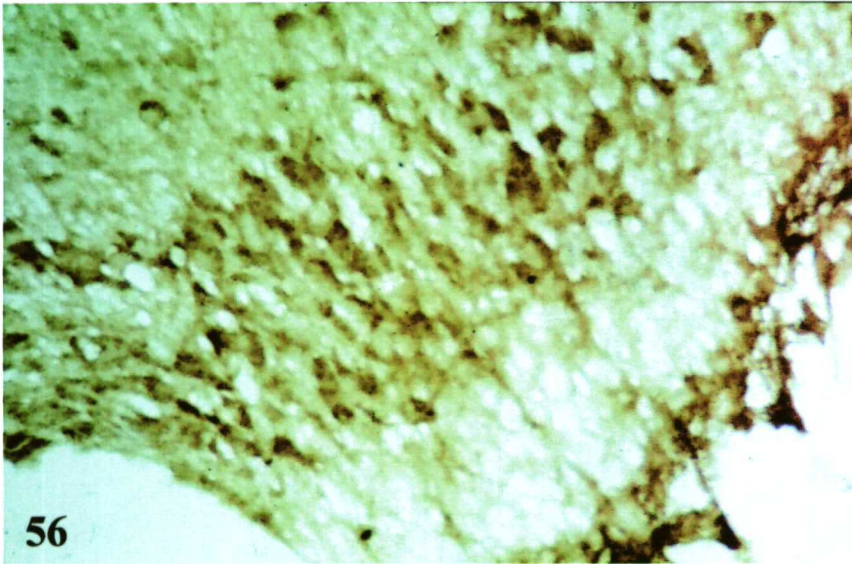
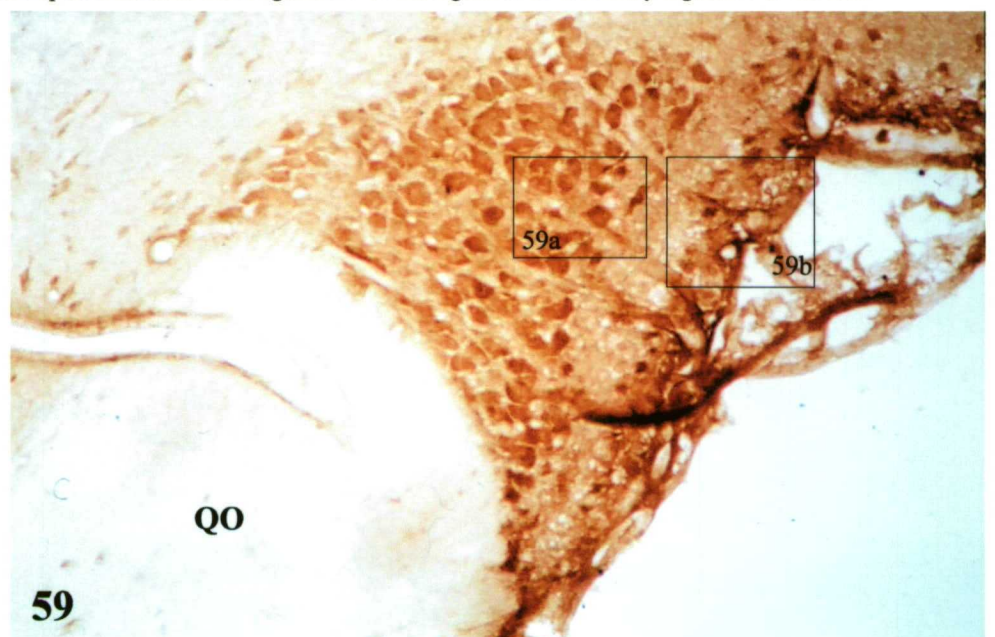
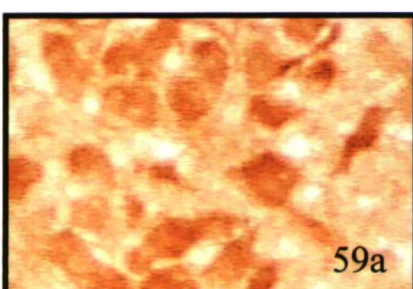
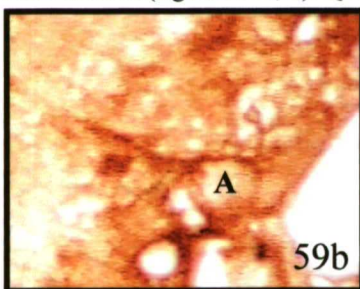


Figura 56. Panorámica del núcleo supraóptico. Se aprecia gran cantidad de marcaje en todo el tejido, no sólo en las neuronas. Por contra, el quiasma óptico no se tiñe y la zona de fibras muy poco. Estadío P14. 800x.

Figura 57. Detalle del núcleo supraóptico donde se pueden ver neuronas positivamente teñidas para la tenascina. Estadío M1. 1.600x.

Figura 58. Panorámica del núcleo supraóptico. Se observa tinción también en astrocitos (A) de la capa limitante externa en la parte más ventral del núcleo. NSO. TEN. M1. 900x.

Figura 59. Panorámica del núcleo supraóptico donde se observa que las células del mismo están intensamente teñidas. Se observan los haces de fibras se reúnen para bajar hacia la zona de dendritas, donde se marcan intensamente los astrocitos (A) de la capa limitante externa (figuras 59a, b). QO: Quiasma óptico. Estadío A1. Figura 59: 400x; figura 59a: 1.000x; y figura 59b: 1.300x.



Inmunodetección de tenascina

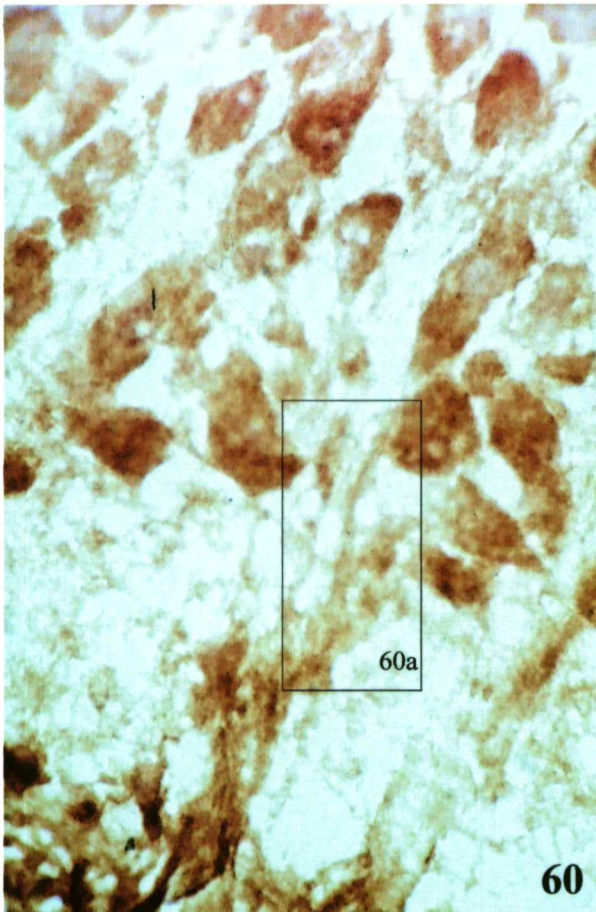


Figura 60. Detalle del núcleo supraóptico. Se observa el marcaje de dendritas (figura 60a) que descienden a la zona ventral. Estadío A1. Figura 60: 1.600x; y figura 60a: 3.700x.

Figura 61. Detalle de dos neuronas teñidas del núcleo paraventricular que destacan sobre las otras más tenues. Estadío P21. 1.770x.

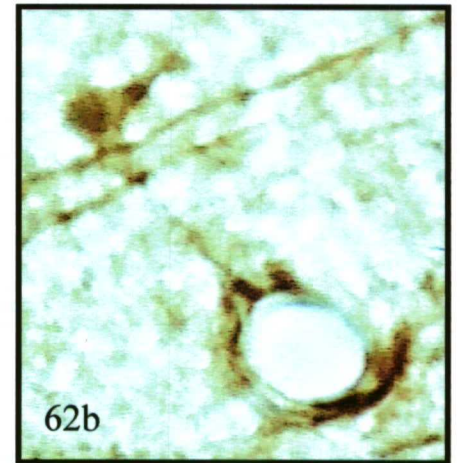
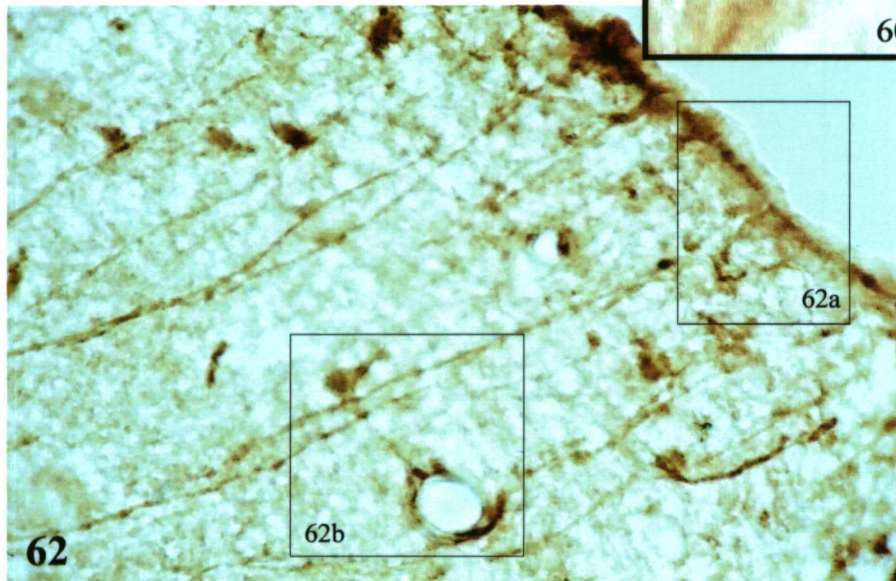
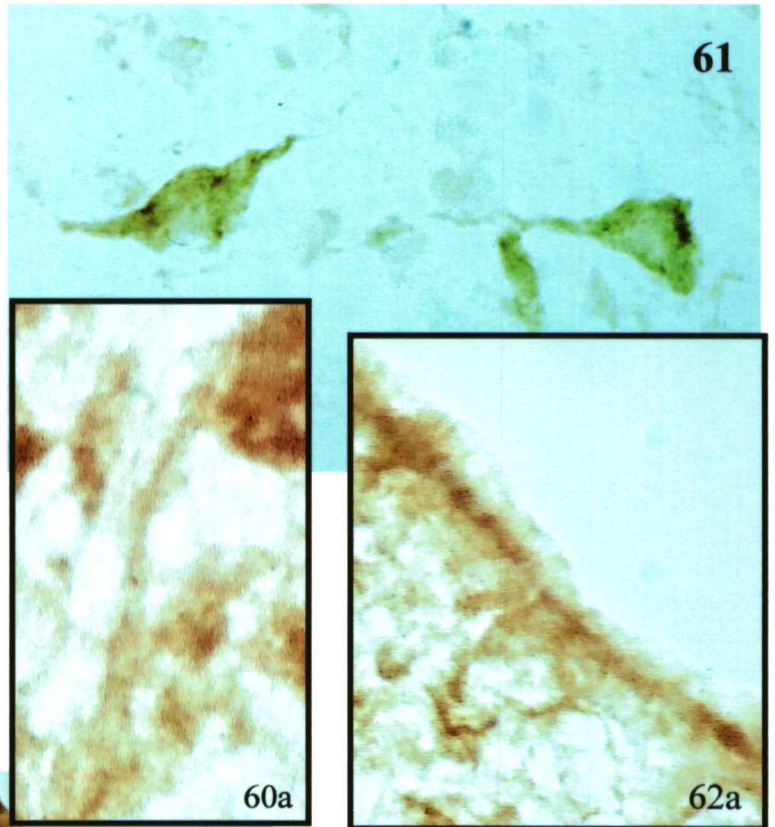
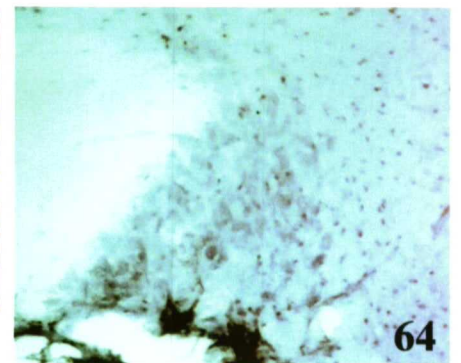
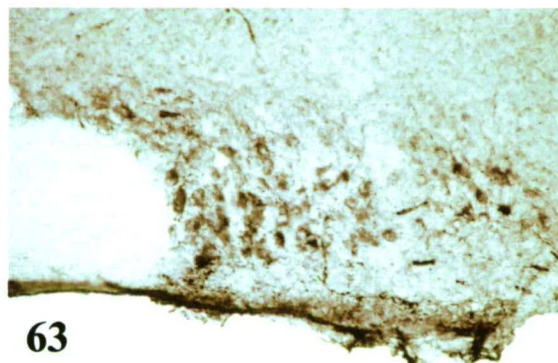


Figura 62. En el epéndimo encontramos una lámina de marcaje en la capa limitante interna (figura 62a), así como astrocitos bien marcados en las proximidades (figura 62b). Estadío A2. Figura 62: 1.400x; figura 62a: 2.600x; y figura 62b: 2.630x.

Figura 63 y 64. Panorámicas del núcleo supraóptico en estadío M3 en lactancia (figura 63) y no lactancia (figura 64). Nótese que en el periodo de lactancia existe más inmunorreactividad.



II.- Resultados del experimento de lactancia en rata

En las pruebas hechas en ratas vírgenes y lactantes no se observan diferencias con las siguientes pruebas: NADPH diaforasa, aglutinina de la *Wisteria floribunda* y de *Pisum sativum*, proteoglucanos condroitín 0, 4 y 6 sulfato y proteoglucano queratán sulfato. Sin embargo sí se aprecian diferencias entre las ratas con anticuerpos contra tenascina. Se observan neuronas marcadas intensamente en los núcleos supraóptico y paraventricular de las ratas lactantes. En el núcleo supraóptico aparece marcaje significativamente superior en determinadas neuronas (fig. 63) comparadas con la situación control (fig. 64). Se observaban los somas celulares muy marcados, así como algunas prolongaciones neuronales, que no aparecían en el control.

III.- Resultados de colocalización de matriz extracelular

En el núcleo supraóptico se obtuvieron solamente marcajes negativos con la aglutinina de *Wisteria floribunda* en rata. Sin embargo, con calretinina tenemos marcaje muy positivo en este núcleo (fig. 75). El marcaje de la proteína gliofibrilar ácida aparece por todo el núcleo, pero es mucho más intenso en la zona limitante glial externa en la zona más ventral del núcleo supraóptico que en su parte dorsal (fig. 72). También existe un marcaje bastante intenso con la glutamina sintetasa (fig. 70) donde se observa la superficie de las neuronas bien marcada formando una lámina que la recubre denotando la participación de prolongaciones de astrocitos recubriéndolas. El marcaje en la zona intersomática neuronal está bien teñido. No se observa aumento de marcaje en la zona que aparecía fuerte marcaje de la proteína gliofibrilar ácida.

En el núcleo paraventricular, ocurre igual que en el núcleo supraóptico, a nivel de marcaje de redes perineuronales con la aglutinina de la *Wisteria floribunda* es negativo. El marcaje contra la proteína gliofibrilar ácida (fig. 73) en este núcleo se concentra en la zona periventricular y también en la periferia de los vasos sanguíneos. Mientras que con la glutamina sintetasa (fig. 71) el marcaje aparece más homogéneamente distribuido en el núcleo y se concentraba en la periferia de las neuronas magnocelulares. Cabe destacar que el neuropilo era bastante inmunonegativo para la glutamina sintetasa fuera del núcleo paraventricular. El marcaje con calretinina se da en neuronas parvocelulares encontrándose ausente en las magnocelulares.

En el núcleo magnocelular preóptico, aparecen redes perineuronales de tipo clásico en forma de red con marcaje de la aglutinina de la *Wisteria floribunda*. En rata existe colocalización de neuronas aglutinina de la *Wisteria floribunda* positiva, con parvalbúmina positiva (fig. 67). Pero no todas las neuronas parvalbúmina positivas son aglutinina de la *Wisteria floribunda* positivas, también hay muchas negativas (figs. 65 y 66). La colocalización no es completa. Respecto a glutamina sintetasa y proteína gliofibrilar ácida tienen igual marcaje, como era de esperar. En la doble colocalización entre la aglutinina de la *Wisteria floribunda* y la proteína gliofibrilar ácida, se puede observar como el marcaje de los astrocitos sisea entre el marcaje de red colocalizándose en determinadas zonas (fig. 74), demostrándose una íntima relación entre el marcaje de matriz extracelular y las prolongaciones de astrocitos cargadas de estos filamentos intermedios. El marcaje de colina acetil transferasa es negativo para la colocalización con la aglutinina de la *Wisteria floribunda*, pero el núcleo es positivo para dicho marcaje (fig. 78). No se detectó ninguna otra colocalización. También se pudo observar reactividad de calretinina en este núcleo (fig. 76), sin embargo, era escasa y no tan

fuerte como la que aparecía en el núcleo paraventricular o supraóptico. Aunque existían muchas prolongaciones marcadas.

También es apreciable una tendencia general de mayor marcaje de proteína gliofibrilar ácida. Se observa que donde existe mayor marcaje de este marcador de astrocitos y glutamina sintetasa (otro marcador de astrocitos) hay una disminución muy marcada de matriz extracelular, siendo máxima en el núcleo supraóptico hasta el punto de ser negativo para la aglutinina de la *Wisteria floribunda*.

Las neuronas con redes perineuronales y marcadas con la proteína gliofibrilar ácida en doble inmunofluorescencia tienen multitud de llegadas de prolongaciones astrocitarias. Estas prolongaciones al aproximarse a la superficie de la neurona se dividen y superponen al marcaje de matriz extracelular de forma sinuosa sorteando las zonas no marcadas con la aglutinina de la *Wisteria floribunda*.

Se ha observado asimismo gran cantidad de marcaje de calretinina en los axones que componen el quiasma óptico (fig. 77), dando un aspecto punteado o rayado a dicha estructura dependiendo de la orientación de las fibras. También se marcan dichos axones con parvalbúmina (fig. 68). Además hemos podido comprobar que aparece un pequeño marcaje de la aglutinina de la *Wisteria floribunda* en el quiasma óptico (fig. 69), a pesar de que en la inmunotinción a microscopía óptica no fluorescente no aparecía marcaje. Este marcaje parece coincidir con los nodos de Ranvier que existen en el quiasma óptico (fig. 69a).

Tablas de resultados de colocación

RATA	WFA	PV	GS	PGFA	AChT	Cr
NSO	-	-	++	++	-	++
NPV	-	-	+	+ d / ++ v	-	+
NMPO	+RP	+	+	+	+	+

Leyenda de siglas:

- WFA: Aglutinina de la *Wisteria floribunda*
- PV: Parvalbúmina
- GS: Glutamina sintetasa
- PGFA: Proteína gliofibrilar ácida
- AChT: Acetil colín transferasa
- Cr: Calretinina
- NSO: Núcleo supraóptico
- NPV: Núcleo paraventricular

- NMPO: Núcleo magnocelular preóptico
- RP: Redes perineuronales

Leyenda de signos:

- + existencia de marcaje
- ++ fuerte marcaje
- no existe marcaje
- d: región dorsal
- v: región ventral

Doble inmunodetección en fluorescencia

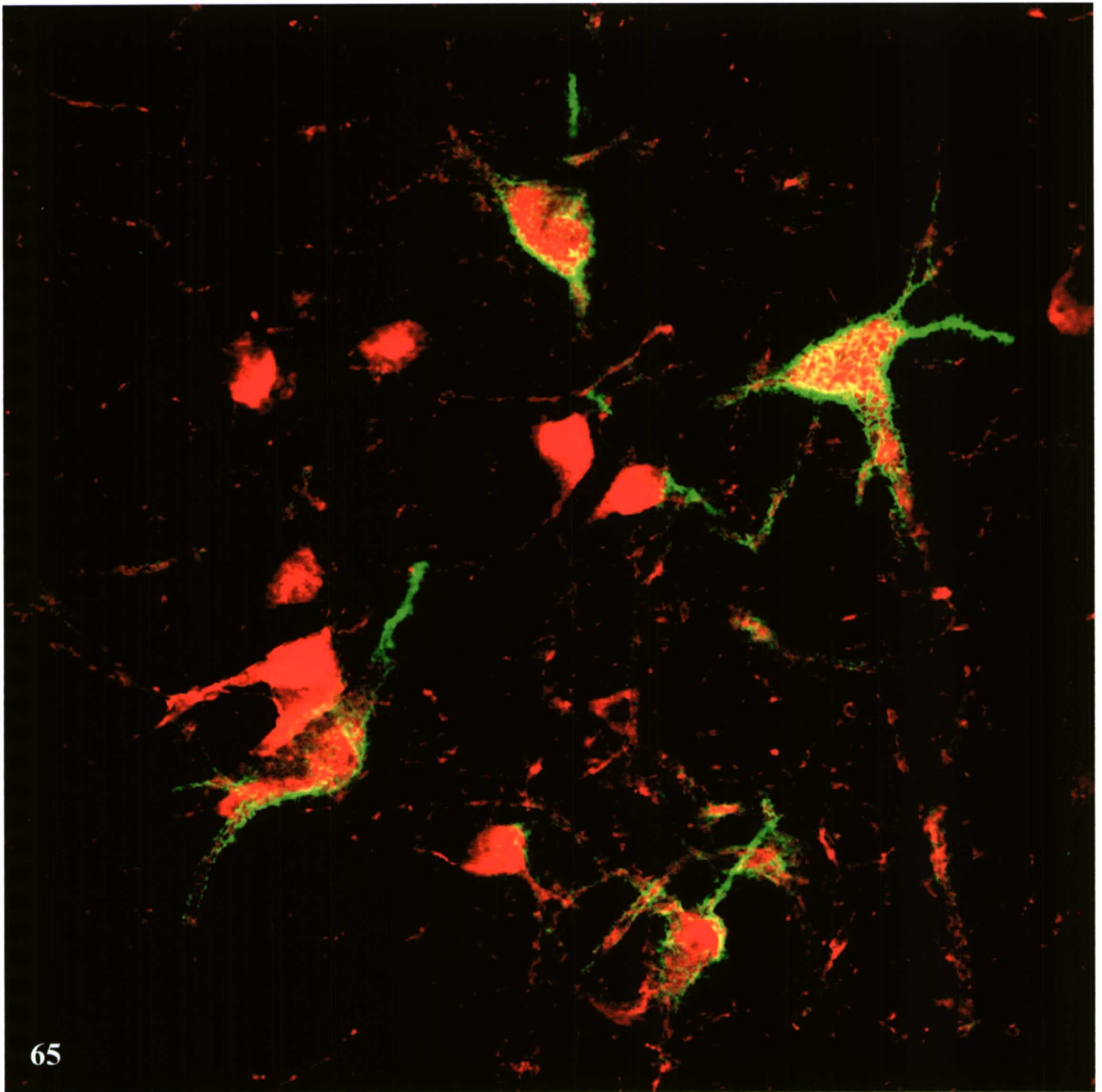


Figura 65. Imagen de doble localización en fluorescencia en el núcleo magnocelular preóptico en la que se marca con verde la matriz extracelular puesta de manifiesto por la aglutinina de la *Wisteria floribunda* y en rojo parvalbúmina. De esta forma se puede observar doble localización de estas dos sustancias en algunas neuronas. En otras neuronas se puede observar cómo únicamente contienen parvalbúmina sin marcarse la matriz extracelular. Sin embargo no aparecen neuronas sólo marcadas por la aglutinina. O dicho de otro modo, todas las neuronas que tienen redes perineuronales marcadas con la aglutinina contienen parvalbúmina. También se puede observar el fuerte marcaje de matriz extracelular que aparece en el segmento inicial del axón de algunas neuronas. 4.000x.

Doble inmunodetección en fluorescencia

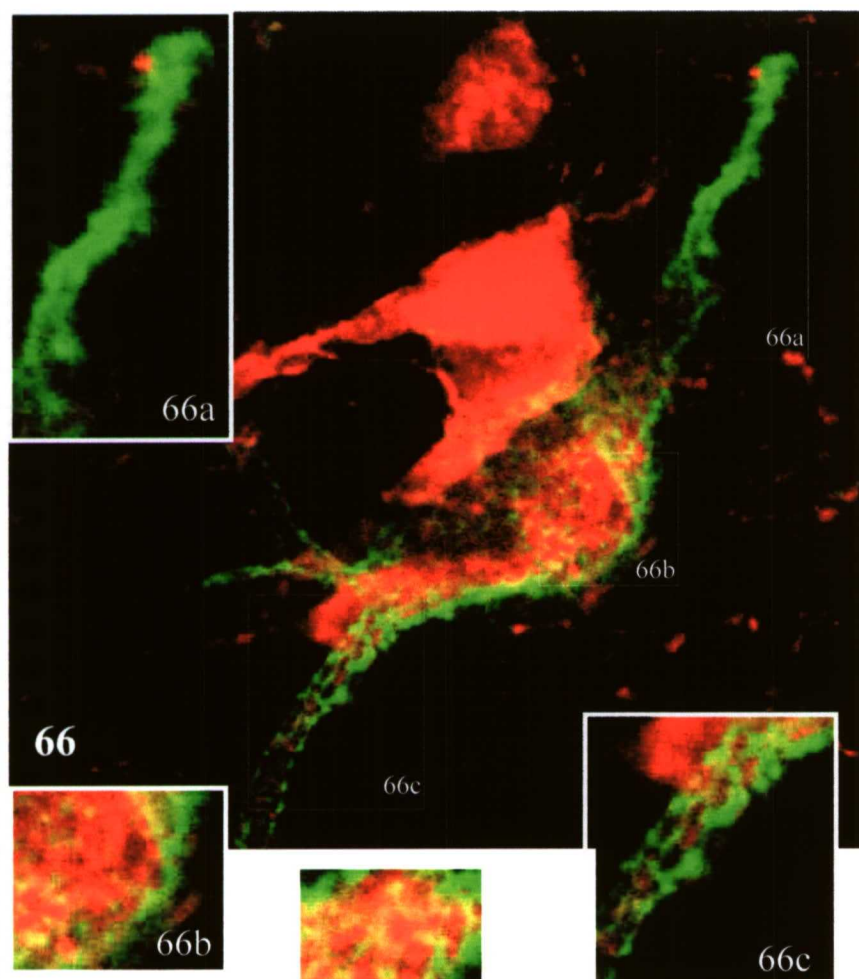


Figura 66. Dos neuronas del núcleo magnocelular preóptico, detalle de la figura anterior. Método de doble inmunofluorescencia, siendo el marcaje de verde la matriz extracelular puesta de manifiesto por la aglutinina de la *Wisteria floribunda* y de rojo por parvalbúmina. En la imagen aparecen dos neuronas, las dos contienen parvalbúmina. La neurona de la parte inferior además está marcada en su superficie con matriz extracelular observándose las estructuras conocidas como redes perineuronales en forma de red (figura 66b, c). En la parte superior de esta neurona se puede observar el aumento de marcaje de matriz extracelular en el segmento inicial del axón (figura 66a). Figura 66: 7.000x; figura 66a: 11.500x; figura 66b: 10.400x; y figura 66c: 10.440x.

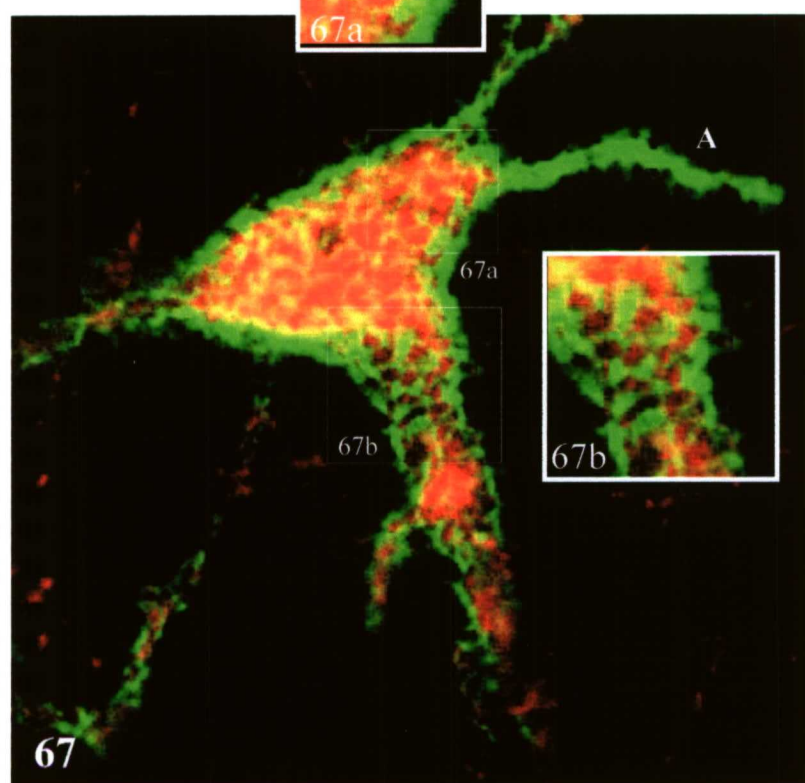
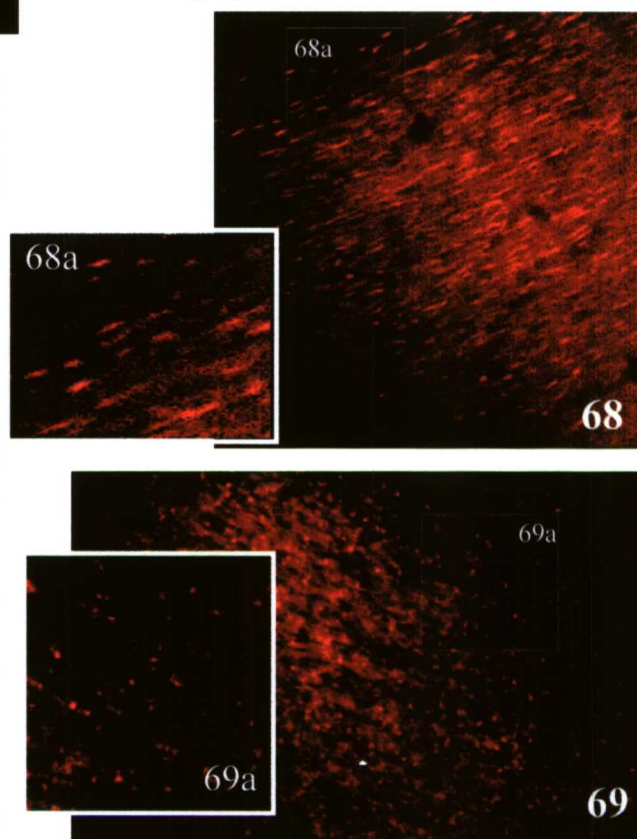


Figura 67. Neurona del núcleo magnocelular preóptico. Con doble marcaje en fluorescencia, siendo marcada la matriz extracelular con la aglutinina de la *Wisteria floribunda* y en rojo parvalbúmina. Se puede observar claramente el doble marcaje en la misma neurona. Esta célula se rodea con un marcaje muy claro de matriz extracelular en forma de red perineuronal de tipo clásico, en forma de red (figura 67a, b). Asimismo se puede observar el intenso marcaje del segmento inicial del axón (A). Figura 67: 7.700x; figura 67a: 14.300x; y figura 67b: 9.600x.

Figura 68. Quiasma óptico, marcaje de parvalbúmina. Se observan axones bien marcados (figura 68a). Figura 68: 1.200x; y figura 68a: 3.000x.

Figura 69. Quiasma óptico, marcaje de la aglutinina de la *Wisteria floribunda* en forma discontinua marcando los nodos de Ranvier (figura 69a). Figura 69: 1.100x; y figura 69a: 4.200x.



Inmunodetección en fluorescencia

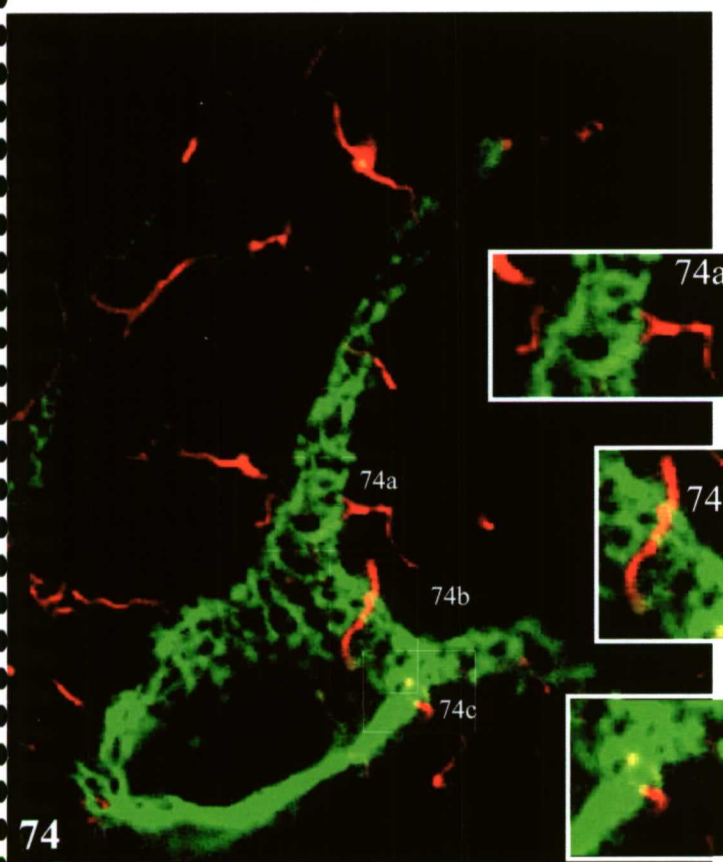
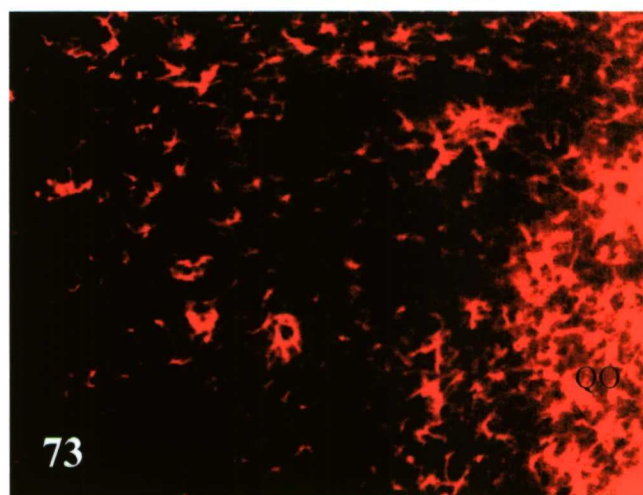
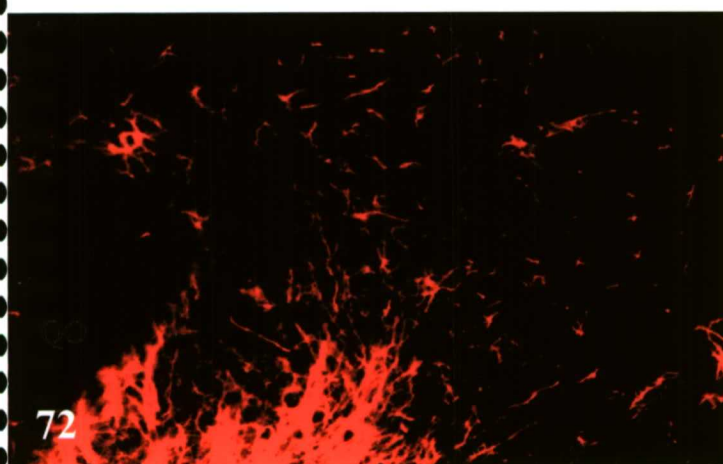
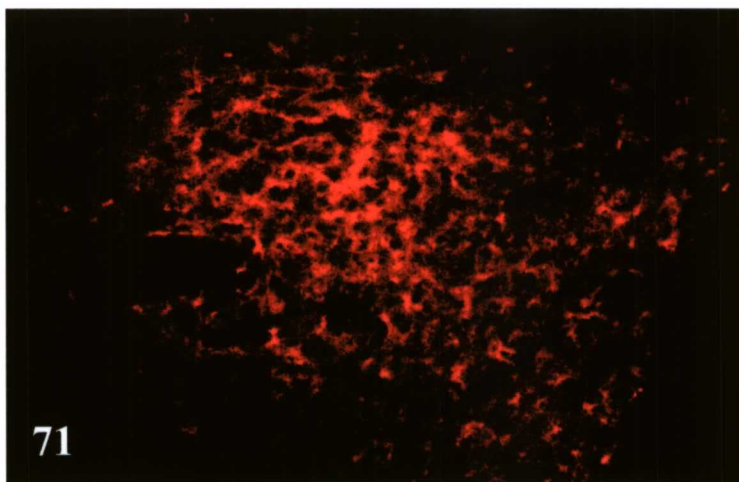
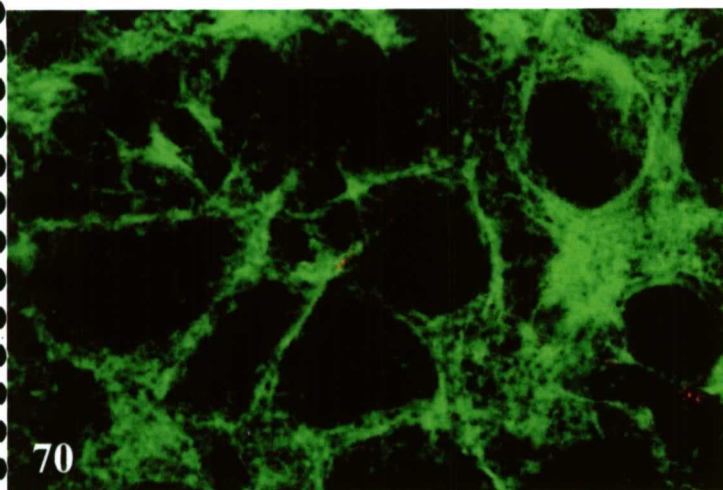


Figura 70. Detalle de neuronas del núcleo supraóptico marcadas en verde con glutamina sintetasa. Se observan que las prolongaciones de los astrocitos rodean la superficie de las neuronas dejando huecos para la entrada de prolongaciones de otras células. 5.100x.

Figura 71. Panorámica del núcleo paraventricular marcado con glutamina sintetasa en el que se observa un incremento de marcaje en el interior del mismo frente al marcaje en el neuropilo. 550x.

Figura 72. Vista del núcleo supraóptico con marcaje contra la proteína gliofibrilar ácida, observándose el gran marcaje de la limitante externa en la parte inferior del núcleo y rodeando algunos vasos sanguíneos. 540x.

Figura 73. Panorámica del núcleo paraventricular con marcaje de la proteína gliofibrilar ácida, observándose fuerte marcaje en la limitante interna así como en la periferia de los vasos sanguíneos. 1.200x.

Figura 74. Detalle de una neurona del núcleo magnocelular preóptico. Doble marcaje, en verde matriz extracelular con la aglutinina de la *Wisteria floribunda* y en rojo la proteína gliofibrilar ácida. Se observan claramente las redes perineuronales en forma de red y entre estas estructuras las prolongaciones astrocitarias marcadas que se internan entre las redes (figuras 74a, b, c). Figura 74: 7.750x; figura 74a: 11.600x; figura 74b: 12.000x; y figura 74c: 11.600x.

Inmunodetección en fluorescencia

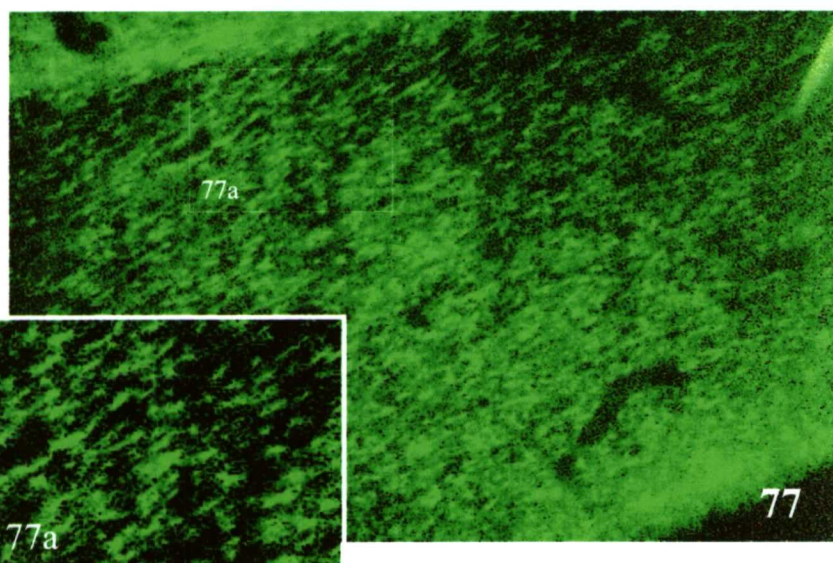
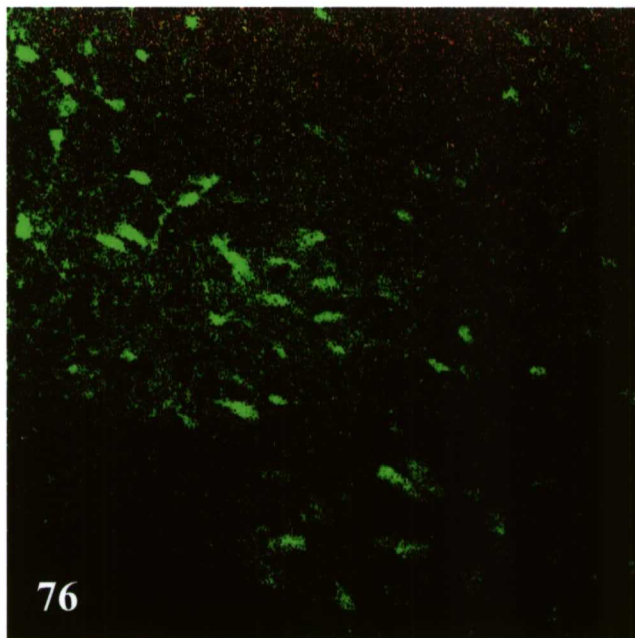
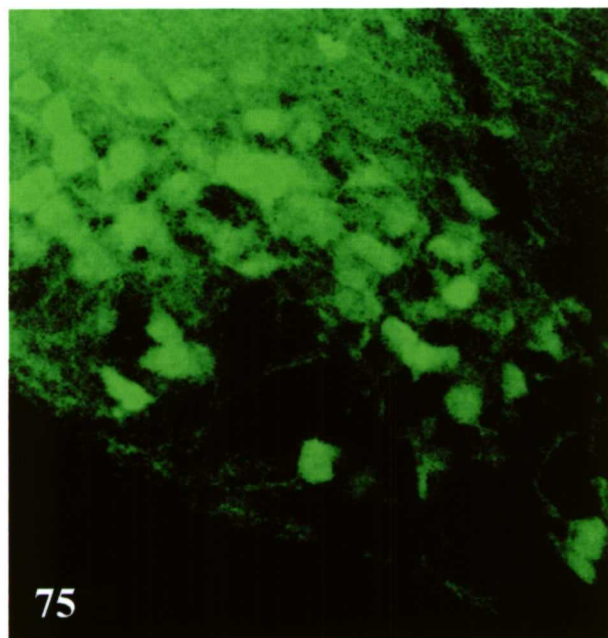


Figura 75. Panorámica del núcleo supraóptico marcado con anticuerpos contra calretinina. Se puede observar la fuerte reactividad de las neuronas magnocelulares del núcleo, así como en sus prolongaciones. También se observa marcaje en la zona de la capa más ventral de las dendritas. Estadío M3. 1.450x.

Figura 76. Panorámica del núcleo magnocelular preóptico. Marcaje de calretinina. Se observan el marcaje menos intenso de neuronas y sus prolongaciones que en el núcleo supraóptico o que en el núcleo paraventricular. Hay muchas neuronas que no se tiñen o si lo hacen son muy tenues. Además se aparece gran cantidad de prolongaciones marcadas. Estadío M3. 1.000x.

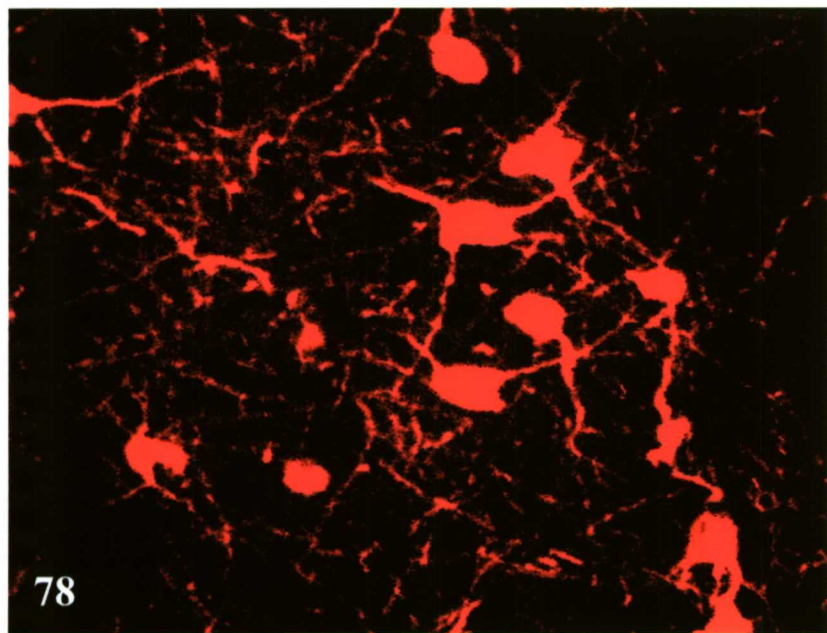


Figura 77. Panorámica del quiasma óptico. Marcaje de calretinina. Se observan marcadas las prolongaciones neuronales axónicas de forma bastante intensa. El marcaje tiene aspecto discontinuo pues los axones marcados en esta sección transversal están cortados. Estadío M3. Figura 77: 950x; y figura 77a: 1.740x.

Figura 78. Panorámica del núcleo magnocelular preóptico del hipotálamo. En él se puede observar el marcaje de colina acetil transferasa en el soma neuronal y en sus prolongaciones de forma muy intensa. Se tiñen pocas neuronas, pero las que lo hacen tienen el típico aspecto de las neuronas magnocelulares de este núcleo. Estadío M3. 3.100x.

DISCUSIÓN

1.- Las redes perineuronales

Las redes perineuronales tienen una gran complejidad estructural y de componentes. Una evidencia del aserto anterior estaría reflejada por la multiplicidad de métodos de detección aplicables a su estudio.

Se encuentra marcaje de matriz extracelular tanto en la superficie de las neuronas como en el resto de los componentes nerviosos. Las superficies de las neuronas de todos los núcleos estudiados aparecen generalmente bien marcadas, si bien sólo en el núcleo magnocelular preóptico aparece el marcaje de redes perineuronales clásico igual que el descrito para corteza cerebral. Se observa en la superficie de las neuronas un aumento de la densidad de marcaje de matriz extracelular en los núcleos supraóptico y paraventricular. Este marcaje no es igual que el que se obtiene en corteza con la clásica forma de red, sino que se observa una acumulación de la tinción de tipo difusa y aspecto granulado. Varios autores también identifican a este tipo de matriz extracelular como una forma de redes perineuronales y proponen que se les llame redes perineuronales difusas o sin forma de red. (Härtig et al., 1.994, 1.995, 2.001)

Varios estudios muestran que neuronas motoras y relacionadas con ellas, así como otras interneuronas que contienen GABA en el sistema nervioso central maduro, se marcan con redes perineuronales de proteoglucanos que son reactivas con el método de hierro coloidal y fucsina paraldehído, y que son idénticos a los agregados reticulares de Golgi y al retículo superficial de Cajal (Murakami et al., 1994; 1996; 1999). Por estas razones hemos

estudiado los núcleos del hipotálamo con la técnica del hierro coloidal. Hemos obtenido los mismos resultados que otros investigadores citados en el párrafo anterior en corteza cerebral y otras zonas del sistema nervioso central. Y por primera vez detectamos un fuerte marcaje en los núcleos supraóptico y paraventricular (Clement et al., 1.995, 1.997), indicando que existe una fuerte matriz extracelular de componentes altamente cargados negativamente. Siendo el tipo de marcaje similar a lo que describen otros autores como redes perineuronales de tipo difuso (Härtig et al., 1.994).

Se estudiaron las redes perineuronales cargadas positivamente con el método del hierro coloidal a pH 8.0 por el Profesor Murakami et al. (2001). Estos investigadores las llaman redes perineuronales catiónicas debido al pH con el que se tiñen. Aparecen estas estructuras alrededor de la sinapsis, depositándose el colorante en la matriz extracelular. Según la bibliografía son los primeros que han detectado redes perineuronales a dicho pH (Celio et al., 1998; Yamaguchi, 2000). Parece ser que las neuronas marcadas con este método no son idénticas a las neuronas marcadas con el hierro coloidal clásico a pH 4.0 ó 5.0. Estos autores postulan que estas estructuras serían más numerosas de lo que en un principio se podría creer. Pues a las ya clásicas redes perineuronales en las que la mayoría de sus componentes serían compuestos aniónicos (Murakami et al., 1986), se tendrían que sumar otras redes en las que gran parte de los constituyentes tendrían que ser catiónicos (Murakami et al., 2001).

Por tanto, parece demostrarse que las redes perineuronales no sólo son muy heterogéneas en la composición de una sólo de estas estructuras, sino también que pueden existir dos redes perineuronales distintas compuestas por constituyentes diferentes. Ello puede explicar el inexistente marcaje de la aglutinina de la *Wisteria floribunda* en los núcleos supraóptico y paraventricular (Clement et al., 1.997, 2.000), siendo positivo el resto de

marcaje en estos núcleos. Una composición altamente especializada de la matriz extracelular dependiendo de la zona funcional y de la actividad de ésta. Otro ejemplo lo tenemos en el trabajo de Murakami y col. (1.999) en el que detectan redes marcadas con azul de metileno y no con la aglutinina de la *Wisteria floribunda* no siendo la correlación completa.

Según nuestros resultados, existen zonas en las que no encontramos redes perineuronales clásicas, como las que se marcan con la aglutinina de la *Wisteria floribunda*, pues parece ser que sólo marcaría las de carácter aniónico. Sin embargo, en el núcleo supraóptico y paraventricular se encuentra marcaje de diferentes condroitín sulfatos, descritos como marcadores de redes perineuronales (Härtig et al., 1.994). Denotando marcaje en estos núcleos, como redes perineuronales difusas. En los resultados se describe el marcaje que poseen estos núcleos con el hierro coloidal a pH 4.0, luego se podría enmarcar dentro de lo que se está llamando actualmente redes perineuronales difusas aniónicas. Las células de Purkinje en la corteza del cerebelo muestran poca reacción al método de hierro coloidal o fucsina paraldehído (Murakami et al., 1996; Seeger et al., 1994). Otros autores demostraron que dichas células son reactivas a dichos métodos cuando se intensifican con el método de la plata de Bodian (Murakami et al., 1997; Hong et al., 2000) así como también aparece doble marcaje en neuronas de los núcleos cerebelares que se tiñen con el método del hierro coloidal y tienen calbindina D28k (Ohtsuka et al., 2000). Además también confirmaron la existencia de glucoproteínas de superficie celular que unen la aglutinina de *Vicia villosa*. Debido a estos últimos avances en la histoquímica del hierro coloidal, es posible que en lugares que no teníamos marcaje especialmente fuerte, tengamos que afinar la técnica con la plata de Bodian. O incluso, tener que probar la existencia o no de redes perineuronales catiónicas con dicha técnica con el hierro coloidal a pH 8.0.

También hemos detectado abundante marcaje de matriz extracelular en zonas próximas a los núcleos magnocelulares estudiados. Por ejemplo, en sustancia blanca, el quiasma óptico presenta marcaje de matriz extracelular de forma puntuada. Esta morfología punteada aparece entre las vainas de mielina. Luego se observa gran cantidad de marcaje de matriz extracelular de proteoglucanos y tenascina en los nodos de Ranvier. Otros investigadores también han encontrado marcaje con distintos marcadores de matriz extracelular en los nodos de Ranvier en otras zonas diferentes no hipotalámicas de sustancia blanca de sistema nervioso central (Brückner et al., 1.993; 1.996; 1.998, 1.999, 2.000, 2.001; Derouiche et al., 1.991, 1.996; Köppe et al., 1.997). La detección puntual en estas zonas denota una función relacionada siempre con la conducción del impulso nervioso. En estas áreas puede tener un papel de creación de un microambiente protector para el tránsito rápido de iones por el carácter polianiónico de sus componentes.

Otra zonas muy bien provistas de gran cantidad de matriz extracelular han sido las limitantes del sistema nervioso central. Encontramos abundante matriz extracelular en la limitante interna, periférica al epéndimo observada a la vez que el núcleo paraventricular, y también en la limitante externa, bordeando el límite del tejido nervioso con las meninges en la zona de fibras del núcleo supraóptico. La zona del epéndimo en la mayoría de los compuestos de matriz extracelular estudiados aparecía bien marcada. Con más intensidad en los primeros estadios de la ontogenia, y paulatinamente con la edad iba disminuyendo hasta que quedaba marcado más o menos permanente en el tiempo. Algunas veces formaba una lámina de marcaje en la base de los ependimocitos. Este marcaje se podría relacionar con las prolongaciones de los astrocitos próximas que podrían sintetizar matriz extracelular abundante para crear un tamiz tridimensional e impedir el paso de sustancias libremente.

La glía limitante ventral, subyacente al núcleo supraóptico, incluye una población de astrocitos que extienden sus prolongaciones hacia las zonas dendríticas y de cuerpos celulares de las neuronas magnocelulares (Salm y Hatton, 1.980; Salm et al., 1.985; Singleton y Salm, 1.996). Esta zona de fibras del núcleo supraóptico tiene gran cantidad de matriz extracelular. Y se mantiene abundante durante toda la vida del animal. Es una zona donde existe gran cantidad de sinapsis. La función principal de la matriz extracelular en este caso sería la de promover y estabilizar las sinapsis según las situaciones. Es sabido que en esta zona existe gran plasticidad estructural por parte de los astrocitos y sináptica por parte de las neuronas (Theodosis et al., 1.989; 1.996; Singleton y Salm, 1.996), así como plástica en función de cantidad de marcaje de matriz extracelular según la activación fisiológica (Theodosis et al., 1.989, 1.996, 1.997; 1.999). Por ello, la matriz extracelular se encargaría de permitir la plasticidad manteniendo unas características próximas o similares a las que tenía el resto de sistema nervioso central durante los primeros estadios de la ontogenia.

No sólo se mantiene gran cantidad de matriz extracelular en el núcleo supraóptico sino que cambia la expresión por activación fisiológica de dicho núcleo produciendo más cantidad de tenascina (Singleton y Salm, 1.996). En nuestros resultados también detectamos un aumento en la cantidad de tenascina en el núcleo paraventricular de ratas lactantes al igual que los autores anteriores encontraban mayor expresión en ratas deshidratadas y rehidratadas.

También hemos detectado una considerable concentración de matriz extracelular en la periferia de los vasos sanguíneos, observándolo en microscopía óptica. Pero cuando hemos estudiado este marcaje a microscopía electrónica hemos podido comprobar que el marcaje se sitúa alrededor de la lámina basal de los vasos y rodeando las prolongaciones astrocitarias próximas. Parece ser que cuanto más grande es el calibre del vaso sanguíneo, más intenso es

el marcaje detectado. En este caso, la matriz extracelular podría tener una función similar a la propuesta en la zona periependimaria. Podría establecerse una matriz con una estructura tridimensional que impediría la libre difusión de sustancias, actuando como un filtro selectivo evitando el paso de sustancias dañinas para el sistema nervioso, y a su vez evitando la salida de compuestos necesarios para el normal desarrollo de las funciones neuronales.

Todos los núcleos son marcados con casi todos los anticuerpos que hemos utilizado contra los distintos componentes de matriz extracelular. De forma que cada núcleo, aunque con función previamente documentada distinta, posee básicamente los mismos componentes de matriz extracelular. Si bien, es posible que algún anticuerpo en particular tenga mayor inmunorreactividad con un núcleo que con otros.

Se detecta con el marcaje que nos proporciona la aglutinina de la *Wisteria floribunda* algo interesante. A pesar de que esta lectina marca grandes áreas del tejido nervioso, hemos comprobado que el núcleo supraóptico y paraventricular son negativos para su tinción. Esta lectina se ha descrito como marcadora de proteoglucanos condroitín sulfatos y redes perineuronales por numerosos autores (Härtig et al., 1.995; 1.999, 2.001; Köppe et al., 1.997). Pues en sus experimentos han observado que después del tratamiento con condroitinasa ABC desaparece el marcaje de la lectina *Wisteria floribunda*. Pero es obvio que no debe marcar estos proteoglucanos pues nosotros obtenemos buen marcaje de proteoglucanos condroitín sulfato de todos los tipos, 0, 4 y 6, tanto en el núcleo supraóptico como en el núcleo paraventricular, y por el contrario el marcaje en estos núcleos para la aglutinina de la *Wisteria floribunda* es negativo. Las razones por las que ocurra esto podrían ser porque sean provocadas por las funciones específicas de este núcleo. Puede ser que para la función neurosecretora directa en la neurohipófisis o por su plasticidad, sea necesario no tener estos

radicales de N-acetil galactosamina a la que se une esta lectina, o también no poderse unir a ella por estar unida a otra sustancia.

Sin embargo, en el núcleo magnocelular preóptico tenemos buen marcaje de matriz extracelular con proteoglucanos condroitín 0 y 6-sulfato obteniendo la imagen de las redes perineuronales clásicas. Este marcaje obtenido se colocaliza con el de la aglutinina de la *Wisteria floribunda*. Con el marcaje de proteoglucano condroitín 4-sulfato no aparece este tipo de marcaje, confundiéndose en este núcleo con el del neuropilo. Por lo que se propone que los marcajes de dicha aglutinina y los proteoglucanos condroitín sulfato son independientes, pudiendo coincidir o no en determinadas ocasiones.

Determinados autores proponen que el marcaje de la aglutinina de la *Wisteria floribunda* no está relacionada con las redes perineuronales (Murakami et al., 1.995; 1.999; 2.001). Estos autores proponen, fruto de numerosos experimentos con digestiones enzimáticas, que se unan a glucoproteínas de superficie celular de las neuronas. Sin embargo otros autores demuestran con estudios de microscopía electrónica que agregados de esta lectina se unen a la zona de matriz extracelular que rodea a las neuronas pero que en ningún caso se une a la superficie celular de estas células (Härtig et al., 1.999). Aparte de la detección de la N-acetil galactosamina que es capaz de detectar la aglutinina de la *Wisteria floribunda*, también aparecen en las redes perineuronales sustancias como N-acetil glucosamina y α -manosa (Beneyto et al., 1.999).

En el núcleo magnocelular preóptico se detectaron redes perineuronales de tipo clásico en forma de red. Ya se ha detectado este tipo de marcaje en este núcleo por otros autores (Brückner et al., 1.993), pero con la histoquímica del hierro coloidal. Nosotros corroboramos

estas observaciones con las nuestras con dicha histoquímica y también con lectinas como la de *Wisteria floribunda*, así como con el uso de anticuerpos contra proteoglucanos 0-sulfato y 6-sulfato observándose dichas estructuras. Suponiendo que son las mismas redes sobre las mismas neuronas, podríamos decir que estas estructuras están compuestas por distintos componentes, tal y como dicen varios autores, y no por la acumulación o alta densidad de un único compuesto de matriz extracelular alrededor de estas neuronas.

Los proteoglucanos son conocidos por formar un gel hidratado que al estar negativamente cargado retiene numerosas moléculas de agua (Alberts y col., 1994). Esta formación gelatinosa de tejido actúa como una selectiva criba reguladora de paso de moléculas según su tamaño y carga (Hall et al, 1996; Taguchi et al., 2000). Por ello, se refieren a las redes perineuronales de proteoglucanos como una barrera perisináptica (Murakami, 1994).

Al tratar con la enzima condroitinasa ABC destruyendo los condroitín sulfato proteoglucanos en hipocampo, se comprueba que se afecta la plasticidad neuronal por potenciación a largo plazo (Bukalo et al., 2001). Por lo que si se destruyen las redes perineuronales de estas neuronas, se ven afectadas funcionalmente en la plasticidad. De ello se deduce que estas estructuras son necesarias para que exista dicha función. Los núcleos supraóptico y paraventricular se caracterizan por la plasticidad de sus astrocitos y neuronas (Theodosis et al., 1.997, 1.999) en adultos. Y también hemos detectado gran cantidad de marcaje de condroitín 0, 4 y 6 sulfato proteoglucano, queratán sulfato proteoglucano y tenascina en este trabajo. Es posible que la fuerte concentración de dichas sustancias de matriz extracelular sea necesaria para mantener funcional la plasticidad que existe en estos núcleos y de esta forma conservar de forma óptima su función.

Se hicieron numerosos experimentos de dobles marcajes con distintos marcadores y con la aglutinina de la *Wisteria floribunda*, utilizando técnicas de fluorescencia. Se observaron dobles marcajes de la aglutinina y parvalbúmina. Esta colocación no fue completa. Es decir, existían neuronas inmunorreactivas para parvalbúmina y negativas para la aglutinina. Sin embargo, todas las neuronas marcadas con la aglutinina contienen parvalbúmina. Estos resultados se obtuvieron en el núcleo magnocelular preóptico al igual que otros autores en otras zonas del cerebro (Riedel et al., 2.002; Härtig et al., 1.992; Brauer et al., 1.993, 1.995; Brückner et al., 1.995; Morris y Henderson, 2.000). Sin embargo, en los núcleos supraóptico y paraventricular no se detectaba marcaje con esta aglutinina. Estas observaciones de colocaciones en el núcleo magnocelular preóptico ya han sido descritas con idénticos resultados en otros núcleos y en corteza cerebral por diversos autores. Al igual que ocurría en dichos trabajos, la colocación de las redes perineuronales de tipo clásico en forma de red con la aglutinina de la *Wisteria floribunda* y la parvalbúmina no es completa. Es posible que para que las neuronas posean una red perineuronal de tipo clásico en forma de red es necesario que exista gran cantidad de terminales de N-acetil galactosamina.

Las neuronas de los núcleos supraóptico y paraventricular contienen otra proteína ligante de calcio distinta de la parvalbúmina, la calretinina. Los dobles marcajes realizados en este trabajo han dado como resultado la correlación negativa entre redes perineuronales de tipo clásico y neuronas que contienen calretinina. Puede ser que las neuronas que contienen esta proteína no necesiten tener en la matriz extracelular la presencia de los radicales de N-acetil galactosamina que detecta la aglutinina de la *Wisteria floribunda*. Aparentemente se da una correlación negativa. Esta correlación negativa también ha sido encontrada por otros autores en otras partes del sistema nervioso central (Murakami et al., 2.001), y también en

ganglios basales (Härtig et al., 2001). Se comprobó que las neuronas que contenían calretinina como proteína ligante de iones calcio no tenía ninguna en su superficie redes perineuronales detectadas (Adams y col., 2001).

Experimentos realizados de doble localización con redes perineuronales y acetil colina transferasa tienen una correlación negativa. Idéntico resultado obtienen otros autores en otras áreas del sistema nervioso central como telencéfalo impar, tálamo y tronco cerebral (Adams et al., 2001; Hobohm et al., 1998). Parece ser que la ausencia de redes perineuronales y la expresión de características fisiológicas de baja actividad neuronal están relacionadas, como ocurre en las neuronas colinérgicas. Sin embargo, otros autores (Paul y Ulfig, 1998) han encontrado neuronas que tienen colocalización de acetil colina transferasa y calretinina en el núcleo basal de Meynert, que contienen redes perineuronales de tipo clásicas. Este caso parece ser una excepción, no siendo habitual encontrar estas estructuras de matriz extracelular en neuronas colinérgicas, y en las que expresan calbindina como proteína ligante de calcio.

Llama la atención en las colocalizaciones de la aglutinina de la *Wisteria floribunda* con la proteína gliofibrilar ácida y glutamina sintetasa, ambos marcadores de astrocitos. Las zonas donde se detecta fuerte marcaje de esta aglutinina, se corresponden con menor marcaje de dichas sustancias típicas de astrocitos. Parece existir una correlación negativa no total. Esto ocurre en el núcleo supraóptico y el núcleo paraventricular, donde encontramos fuerte marcaje de los marcadores de astrocitos y una detección nula de la aglutinina. Y al contrario sucede con el núcleo magnocelular preóptico, con fuerte marcaje de la aglutinina, pero muy escaso marcaje de los marcadores astrogliales. Es posible que la función que realice la matriz extracelular creando un microambiente protector y funcional, sea sustituida por otro tipo de matriz extracelular no detectable por la aglutinina como se pone de manifiesto con el marcaje

de otros componentes de matriz, y que esté fuertemente asociado a la actividad de los astrocitos, tal y como muestra la fuerte inmunorreactividad de sus marcadores.

Los dobles marcajes realizados con la proteína gliofibrilar ácida, marcador de astrocitos, y la aglutinina de la *Wisteria floribunda*, marcador de las redes perineuronales, muestran una íntima relación. Algunos autores (Blümcke et al., 1.995; Derouiche et al., 1.996) han estudiado la relación entre prolongaciones gliales y redes perineuronales demostrando que se trata de estructuras diferentes. Además han podido comprobar que cada astrocito puede contactar con varias redes perineuronales, y a la inversa, cada red perineuronal puede estar en contacto con varios astrocitos. En nuestros resultados se observa cómo el marcaje de las prolongaciones de los astrocitos es sinuoso entre las oquedades de las redes perineuronales. Resultados similares son obtenidos por otros autores (Viggiano et al., 2.000). En su trabajo concluyen con la existencia de dos estructuras concéntricas de las redes perineuronales. Una externa consistente en terminaciones astrogliales, llamadas redes perineuronales gliales. Y otra interna compuesta por matriz extracelular, llamada redes perineuronales de matriz extracelular. Con la definición de ambos tipos de redes perineuronales estamos de acuerdo en este trabajo, puesto que sin la existencia de una, no podría formarse la otra. Los astrocitos y también las neuronas poseen en su interior y en la superficie de su membrana compuestos de matriz extracelular tal y como se demuestra con las imágenes de microscopía electrónica de marcaje con oro coloidal de dichos compuestos. Otros autores también han demostrado que secretan compuestos como condroitín sulfato y tenascina los astrocitos (McKeon et al., 1.995), compuestos que forman parte de las redes perineuronales (Celio, 1.993; Härtig et al., 1.994) y que posiblemente unen la aglutinina de la *Wisteria floribunda* (Brückner et al., 1.993; 1.996).

Los resultados de los dobles marcajes de glutamina sintetasa y la aglutinina de la *Wisteria floribunda* dan como resultado en nuestros experimentos una relación interesante. Las redes perineuronales de tipo difuso detectadas en los núcleos supraóptico y paraventricular no son detectadas con esta aglutinina pero sí con marcaje contra proteoglucanos condroitín sulfato. En estos núcleos el marcaje de la glutamina sintetasa es muy intenso, siendo más en el núcleo supraóptico. Sin embargo, en el núcleo magnocelular preóptico, donde obtenemos redes perineuronales de tipo clásicas, el marcaje de glutamina sintetasa es muy moderado. De esta forma aparece una correlación positiva entre las redes perineuronales de tipo difuso y el marcaje con la glutamina sintetasa. Así, existe una correlación negativa entre el marcaje de las redes perineuronales de tipo clásico y el de la glutamina sintetasa. Parece como si donde existieran redes clásicas, no haría falta una presencia tan acusada de prolongaciones astrocitarias. Y donde existen redes difusas, es necesaria la presencia de gran cantidad de prolongaciones de astrocitos. Desde este punto de vista se podría decir que las redes perineuronales de tipo clásicas confieren tan alta protección a la neurona que no es necesaria la presencia de un gran número de astrocitos asistiendo a la neurona. Y que cuando existen las redes perineuronales difusas, no confieren mucha protección a las neuronas y necesitan una fuerte presencia astrocitaria.

Con el doble marcaje de la proteína gliofibrilar ácida y la aglutinina de la *Wisteria floribunda* encontramos una situación parecida a la que se daba para la glutamina sintetasa. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de mayor protección de las neuronas por parte de los astrocitos cuando existen redes perineuronales difusas.

En el marcaje de matriz extracelular en general, y en el de las redes perineuronales, en particular, existe gran heterogeneidad en la distribución de los componentes alrededor de las

células. Los proteoglucanos y glucoproteínas organizados en una red tridimensional pueden influir en la difusión de neurotransmisores desde células nerviosas. Asimismo, las fuertes cargas negativas de sus componentes polianiónicos, glucosaminoglucanos, pueden activar las redes como cambiador de cationes (Härtig et al., 1.999; 2.001). Todo lo anterior podría explicar las diferencias locales en la composición de las redes perineuronales de la matriz extracelular modulando la velocidad y distancia de difusión de sustancias para su volumen de transmisión (Nicholson y Syková, 1.998).

Según nuestros resultados de inmunodetección a microscopía electrónica encontramos marcajes tanto en neuronas y astrocitos, como en matriz extracelular. En cultivos de neuronas y astrocitos, entre los dos son capaces de sintetizar los compuestos necesarios para sintetizar redes perineuronales similares a las que se observan en tejidos (Brückner y Grosche, 2.001). Otros autores también han encontrado que tanto astrocitos como neuronas son capaces de sintetizar condroitín sulfato proteoglucanos (Lander, 1.998; Oohira et al., 2.000). Estos autores identifican la expresión de varios tipos de condroitín sulfato proteoglucanos lecticanos describiendo a lo largo del desarrollo la expresión de cada uno de ellos bioquímicamente en el cerebro. Los datos de estos autores coinciden con los nuestros cuando demuestran que durante la ontogenia se expresan más cantidad y tipos de condroitín sulfato proteoglucanos que en adulto. Nuestros resultados indican que existe gran cantidad de matriz extracelular durante los primeros estadios de la ontogenia, que paulatinamente va disminuyendo en el neuropilo hasta quedarse en un punto en el que prácticamente desaparece. Y se conservará de esta forma durante la vida adulta. Sin embargo, en los núcleos estudiados donde existen redes perineuronales, el marcaje de matriz extracelular no disminuye tan drásticamente como se describe en el neuropilo, y se conserva en forma de red perineuronal.

Distintos autores han descrito la existencia de marcaje de proteoglucanos en el citoplasma de neuronas y astrocitos en cerebro de ratones adultos (Matsui et al., 1.998). Este marcaje se distribuía preferentemente en el interior celular más que en la matriz extracelular. Estos resultados obtenidos por otros autores apoyan los obtenidos en este trabajo, pues obtenemos gran cantidad de marcaje en el citoplasma celular tanto de neuronas como de astrocitos. Y en algunos casos, la mayoría del marcaje detectado en nuestros experimentos aparece en el citoplasma.

La relina es una proteína de matriz extracelular, y está implicada en la migración neuronal y en el crecimiento de neuritas (D'Arcangelo et al., 1.995). Se ha visto que existe gran concentración de relina en corteza cerebral adulta en interneuronas gabaérgicas. La relina se libera extracelularmente desde los terminales axónicos o por dendritas de interneuronas corticales. Puede ser anclada a la estructura de matriz extracelular y expresada como componentes de las redes perineuronales. Conectando las dendritas por moléculas de adhesión neurona-sustrato a las redes perineuronales desde receptores de integrinas. (Pesold et al., 1.999). De la misma manera que la relina sería expulsada a la matriz extracelular en las proximidades de las sinapsis, pueden ser secretados los compuestos estudiados de condroitín 0, 4 y 6 sulfato al medio. De esta forma serían transportados tanto por prolongaciones de astrocitos, como por dendritas o axones de las neuronas, y secretados en el medio extracelular en las proximidades de las sinapsis, acumulándose en gran concentración, para formar las redes perineuronales.

El marcaje con proteoglucano condroitín 0-sulfato es detectado en el citoplasma del astrocito, en distintos orgánulos. Pero sobre todo y en gran cantidad en neuronas. Las neuronas tienen marcaje además de en el soma, en dendritas y en las vesículas de secreción en

los axones. En la matriz extracelular se sitúa en forma de “parches”, es decir, gran concentración de marcaje en un área más o menos limitada. Estaría en íntima relación con determinadas zonas de las dendritas y en determinados vasos sanguíneos.

El marcaje con proteoglucano condroitín 4-sulfato es detectado en gran cantidad en el astrocito. Bastante mayor marcaje que en neuronas. Aparece en el pericarion y varios orgánulos. En la superficie externa de membrana plasmática y en prolongaciones se acumula gran cantidad. Sobre todo en prolongaciones que rodean algunas dendritas y sinapsis. En neuronas aparece en determinadas zonas del citoplasma que rodea al núcleo. En la matriz extracelular está más homogéneamente distribuido comparado con el marcaje del proteoglucano condroitín 0-sulfato, en las zonas que existe. En la misma neurona puede aparecer en una parte de su superficie y en otra próxima no. Se trata de un marcaje poco homogéneo y denota polarización del marcaje de matriz extracelular en la neurona. El marcaje que otros autores detectan de la aglutinina de la *Wisteria floribunda* es muy parecido al que se detecta en este trabajo con el proteoglucano condroitín 4-sulfato. Aparece marcaje por fuera de las neuronas y no está directamente asociado con las superficies neuronales. También se detectaba asociado a la superficie de dendritas y en espacios extracelulares (Härtig et al., 1.999). Y su distribución es muy repartida no concentrándose en determinadas zonas como el proteoglucano condroitín 0-sulfato. Sin embargo no hemos encontrado marcaje de esta lectina en los núcleos supraóptico y paraventricular. Y sí hemos encontrado marcaje de los otros proteoglucanos condroitines. Por lo que se puede decir que la aglutinina de la *Wisteria floribunda* se une a compuestos diferentes de los condroitines, por lo menos, los que hemos usado en este trabajo. Sin embargo, algunos autores no están de acuerdo y proponen a esta lectina como marcador de proteoglucanos condroitín sulfato (Härtig et al., 1.995; 1.999; 2.001). Aunque también hay numerosos autores que propugnan que dicha aglutinina se une a

distintos compuestos que los condroitín sulfatos proteoglucanos (Murakami et al., 1.999; 2.001).

El marcaje con proteoglucano condroitín 6-sulfato es menos abundante que el de los condroitines 0 y 4 sulfato proteoglucanos. Aparece sobre todo en el citoplasma de las prolongaciones de astrocitos. Menos abundante en retículo endoplásmico rugoso y localmente abundante en gliofilamentos. En las neuronas aparece fundamentalmente en la membrana de las vesículas de secreción en los axones, por la cara del citoplasma. También aparece de forma menos abundante en el citoplasma de las dendritas. En matriz extracelular el marcaje lo situamos en la superficie de las membranas plasmáticas de las prolongaciones de astrocitos y dendritas.

Otros autores (Lander et al., 1.998) han encontrado marcaje de proteoglucanos condroitín sulfato en la superficie de neuronas, así como intracitoplásmicamente. Se demuestra con doble marcaje que el proteoglucano Cat-315 está sintetizado en el aparato de Golgi neuronal. Por lo que proponen que la neurona participa en la síntesis de matriz extracelular.

El marcaje de los gránulos de secreción que obtenemos con inmunodetecciones de proteoglucanos condroitín sulfatos a microscopía electrónica, es similar al obtenido por otros autores detectando componentes de matriz extracelular, como por ejemplo α -manosa (Beneyto et al., 1.999). Dichos autores detectaron α -manosa en la superficie neuronal, tal y como nosotros detectamos los proteoglucanos condroitín 4-sulfatos y en gránulos de secreción. Con lo que proponen que son sintetizados por las neuronas. Además, otros componentes de matriz extracelular integrantes de las redes perineuronales como tenascina,

hialuronato y versicán ha sido demostrado ser producido por la glía (Grumet et al., 1.985; Asher y Bignami, 1.991; Le Baron, 1.996).

Asimismo podríamos inferir que los tres tipos de condroitín sulfato detectados en nuestro trabajo son sintetizados tanto por astrocitos como por neuronas. Si bien con pequeñas diferencias en el porcentaje de síntesis de cada uno. De esta forma según nuestros resultados, dado que encontramos más cantidad de marcaje en neuronas que en astrocitos de proteoglucanos condroitín 0-sulfato, se puede inferir que la célula que sintetiza principalmente este compuesto es la neurona. Sin embargo, debido a que se encuentra más cantidad de marcaje en astrocitos que en neuronas de proteoglucanos condroitín 4-sulfato y 6-sulfato, podemos decir que es el astrocito el principal productor de estos compuestos de matriz extracelular. Se sugiere que astrocitos y neuronas son capaces de sintetizar dichos compuestos, pero lo hacen en distinta proporción.

2.- Matriz extracelular en el desarrollo

La conocida complejidad química de las redes perineuronales en el cerebro en desarrollo y maduro es resultado de la cerrada relación espacial entre las neuronas y glía (Brauer et al., 1.982; 1.984; Brückner et al., 1.993; Derouiche et al., 1.996; Härtig et al., 2.001), y su interactiva contribución a la producción de los diferentes constituyentes de la matriz extracelular (Brückner et al., 1.993; Yamaguchi, 2.000; Brückner y Grosche, 2.001).

La matriz extracelular está envuelta en numerosos procesos morfogénicos que se encuentran acompañados por cambios en sus propiedades fisico-químicas y organización

espacial. En el cerebro adulto contribuye a la comunicación celular y la regulación de actividad neuronal.

La formación de zonas de matriz extracelular engrosadas localmente (Brückner et al., 1.996), o redes perineuronales de matriz extracelular, están acompañadas por un decrecimiento general en la fracción de volumen extracelular durante el desarrollo postnatal (Van Harreveld, 1.972; Lehmenkühler et al., 1.993; Köppe et al., 1.997). Y según nuestros resultados estamos de acuerdo en todos los marcajes estudiados de proteoglucanos de matriz extracelular, pero no ocurre esto mismo con proteínas de matriz extracelular como la tenascina, que tiene una progresión contraria.

En trabajos previos, se ha establecido y aceptado que existe un desarrollo de las redes perineuronales de matriz extracelular siguiendo un gradiente caudo-rostral de diferenciación en ratas (Fujita y Kudo, 1.992; Bignami et al., 1.993; Wintergerst et al., 1.996; Köppe et al., 1.997). Este marcaje sigue el camino similar al de la maduración y el comienzo del cumplimiento de las funciones neuronales. De esta forma alrededor de los 7 días postnatales aparecen estas estructuras en el tronco encefálico como en el núcleo gigantocelular reticular, núcleo del cuerpo trapezoide y núcleo rojo. En el estadio P14 aparece en corteza cerebral. Y en el P35 aparece una distribución similar a adulto con una forma claramente recortada y baja intensidad de marcaje en el neuropilo (Köppe et al., 1.997). En nuestros estudios hemos encontrado que los primeros indicios de redes perineuronales de tipo clásico que aparecen en el hipotálamo coinciden con corteza cerebral alrededor del día 14 postnatal al igual que ocurre con las redes de tipo difuso en el núcleo supraóptico y paraventricular. Si bien la bajada de marcaje en el neuropilo del hipotálamo las detectamos antes, aproximadamente el día 21 postnatal. Con lo que se distinguen perfectamente estas estructuras. También en nuestros

resultados cabe destacar que en el día postnatal 30, el marcaje del neuropilo circundante a los núcleos estudiados es lo suficientemente bajo como para que se distingan con total claridad las redes perineuronales.

Numerosos autores relacionan la aparición de las redes perineuronales de matriz extracelular con la sinaptogénesis. Con lo que correspondería un periodo de acumulación perineuronal de proteoglucanos condroitín sulfato como terminación de la plasticidad sináptica relacionada con la estabilización de sinapsis (Sur et al., 1.988; Hockfield et al., 1.990; Schweizer et al., 1.993). Otros datos, a la vez, muestran que la maduración de las redes corresponden con el progreso de la mielinización (Jacobson, 1.963) en el sistema nervioso.

Durante todo el proceso del desarrollo, detectamos marcaje en todos los núcleos que lo tienen, y en los que no lo tienen, como con la WFA, tampoco lo poseerán en el futuro. Es decir, el marcaje va a permanecer constante, sin cambios de desaparición en áreas o de nuevas apariciones en otras áreas. El hecho del establecimiento de las redes perineuronales tal y como proponen otros autores previamente (Carlson y Hockfield, 1.996; Syková, 1.997), ocurre con la adquisición de propiedades maduras de neuronas y células gliales. La matriz extracelular queda de forma permanente, con características específicas regionales, con heterogeneidad espacial y química del espacio extracelular. Pero para que todo lo anterior ocurra, que se desarrollen las redes perineuronales, también tiene que existir una actividad electrofisiológica establecida de disparo rápido en la neurona (Köppe et al., 1997). Esta actividad es máxima en el periodo de plasticidad sináptica. Y podría ser que las redes perineuronales tengan un papel en la duración del periodo de plasticidad (Hockfield y col., 1.990; Lander et al., 1.997). Sería coherente y explicaría los resultados obtenidos al comprobar que el marcaje en las redes perineuronales de tipo difuso en el núcleo supraóptico

y paraventricular, se mantiene en el tiempo. Está demostrado previamente por otros autores la particularidad de acusada plasticidad sináptica en estos núcleos hipotalámicos (Theodosios et al., 1.996; 1.997; 1.999).

Se ha demostrado que los glucosaminoglucanos de los proteoglucanos de matriz extracelular sirven como modulador del crecimiento de las neuritas durante la formación de redes perineuronales en la formación del sistema nervioso central durante el desarrollo. Y que a altas concentraciones promueve el crecimiento de neuritas y a bajas concentraciones lo inhibe (Oohira et al., 2.000). Por esta razón nos encontramos en los primeros estadios estudiados gran cantidad de marcaje de matriz extracelular en el neuropilo alrededor de los núcleos estudiados. Es necesario que exista esta cantidad para crear un ambiente favorecedor al crecimiento de las neuritas y de esta forma favorecer las conexiones sinápticas que se tienen que producir en el desarrollo postnatal. Una vez establecidas estas conexiones, la matriz extracelular del neuropilo cambia al descender considerablemente. El ambiente ahora es inhibitorio para crecimiento de neuritas. El establecimiento de las conexiones ha terminado. Y es la hora de que maduren y sean funcionales. Sin embargo, queda en determinadas zonas gran cantidad de matriz extracelular como por ejemplo en las redes perineuronales tanto de tipo clásico, como de tipo difuso. En estas zonas especiales es necesario estos compuestos para mantener un microambiente favorable y plástico para la neurona. Pues sin este ambiente no se podría tener la plasticidad observada en los núcleos supraóptico y paraventricular. Otros autores detectan sustancias como el ácido polisiálico que aparece en la matriz extracelular durante el desarrollo y después sólo permanece en zonas donde existe mucha plasticidad, como en el sistema neuro-hipofisario hipotalámico (Bonfanti et al., 1.992; Theodosios et al., 1.999). Estos mismos resultados hemos obtenido nosotros en la misma zona para otros

componentes de matriz extracelular estudiados en este trabajo, como son los proteoglucanos condroitín 0, 4, 6-sulfato, queratán sulfato y tenascina.

El marcaje que detectamos de tenascina se incrementa con el tiempo, al contrario de lo que sucede con los diferentes tipos de proteoglucanos detectados en este trabajo. El marcaje de tenascina tiene un máximo alrededor de la tercera semana de vida, alrededor del día 21 postnatal, coincidente con la maduración funcional de la neurona y el final de la plasticidad sináptica. Puede formar un complejo en la superficie de neuronas maduras provocando un efecto de barrera contra las sinapsis defectuosas o no válidas en formación (Hagihara et al., 1.999), de esta manera, puede estabilizar las sinapsis establecidas. Ello es coincidente con que las redes perineuronales no aparezcan en el desarrollo, sino que aparezcan coincidiendo con la maduración funcional y estabilización de las redes neuronales (Celio y Blümcke, 1.994). El aumento de la tenascina en el espacio extracelular provoca la unión de lecticanos como versicán, agrecán y brevicán (Hagihara et al., 1.999), que son piezas fundamentales en la organización tridimensional de las redes perineuronales. La tenascina está sintetizada tanto por células gliales, astrocitos y oligos, como por neuronas, y se le considera un eslabón fundamental en la estructura de las redes perineuronales (Weber et al., 1.999) al ser capaces de unir compuestos como versicán (Aspberg et al., 1.995), fosfacán (Xiao et al., 1.997; Milev et al., 1.998) así como hialuronectina (Hall et al., 1.993; 1.995) presentes todos ellos en dichas estructuras.

En los primeros estadios el marcaje de todos los anticuerpos suele ser bastante intenso, se distribuye más o menos por todas las áreas del sistema nervioso y lo mismo ocurre en el hipotálamo. Es importante la aparición de esta matriz extracelular para el desarrollo de conexiones entre las células. En los primeros días postnatales tiene que haber gran cantidad de

espacios sin células, “libres” para que haya espacio para el crecimiento de prolongaciones. Estos espacios “libres” son ocupados por matriz extracelular que es permisible para el crecimiento.

Según se avanza en el desarrollo, se observa un descenso generalizado de matriz extracelular muy acentuado que llega a su máximo alrededor del día 14. Ello coincide con que el cerebro del animal alcanza su tamaño adulto. Se supone que las prolongaciones han dejado de crecer y han llegado a sus dianas. Por lo que ya no necesitarían de matriz extracelular permisiva para que crearan un ambiente propicio para el crecimiento neurítico. También es lógico que cuando van dejando de crecer las prolongaciones porque ya han llegado a su destino, la matriz extracelular que queda es menor. Por lo que coincide con lo que observamos, un descenso generalizado de matriz extracelular. Sin embargo, si observamos los núcleos hipotalámicos supraóptico y paraventricular, no se detecta decrecimiento en el marcaje. Esta inmunorreactividad se conserva, teniendo un aspecto descrito como redes perineuronales difusas (Härtig et al., 1.995; 2.001). Y va a permanecer así casi durante toda la vida del animal. Pero en el núcleo magnocelular preóptico el marcaje difuso de matriz extracelular se pierde a la vez que se conserva el inmediato a la superficie de la membrana plasmática de las neuronas que poseen las redes perineuronales clásicas. Estas observaciones coinciden con las de otros autores que citan la aparición de estas estructuras durante la ontogenia en otras partes del sistema nervioso como corteza cerebral (Brückner et al., 1.993; Härtig et al., 1.995; 2.001). Por ello se observa que siempre desde estadios postnatales donde el marcaje de matriz extracelular es máximo, con el tiempo se pierde marcaje. Se conserva en determinadas zonas o áreas en el tiempo. No se ha observado nunca incremento de marcaje en ningún núcleo o área.

Alrededor del día 14 se observa la aparición de mielinización de fibras. Ello coincide con la apertura de los ojos de los animales y los primeros paseos fuera del nido. La cantidad de matriz extracelular en este estadio, ya ha bajado mucho respecto al primer día postnatal. Las prolongaciones han crecido y ya han llegado a su diana. Ahora se comenzarán a establecer las conexiones definitivas y empieza a establecerse el final de la plasticidad sináptica en la mayoría de las áreas. Aunque la plasticidad se conservará en otras como en el núcleo supraóptico y paraventricular. En este estadio se empieza a establecer la matriz extracelular adulta. En corteza cerebral empiezan a definirse el contorno alrededor de algunas células, dando la imagen de redes perineuronales no clásicas, sin redes. Lo mismo ocurre en el núcleo magnocelular preóptico, se define el contorno de algunas células.

Un cambio apreciable en la matriz extracelular alrededor de los días 14 y 21 se puede observar. El marcaje general disminuye, y se observa que se define la matriz adulta. En este tiempo se establecen las sinapsis definitivas. Y para su estabilización es necesaria la presencia de una alta densidad de matriz extracelular en la superficie de la neurona tal y como demuestran otros autores en otras áreas del sistema nervioso central como en corteza cerebral (Hockfield et al., 1.990). A la vez que crea un microambiente polianiónico propicio para el buen funcionamiento de estas células (Brückner et al., 1.993), sobre todo las que reciben gran cantidad de información. Esto mismo ocurre en diferentes zonas, pero esta acumulación de matriz extracelular sobre la superficie de la neurona no siempre tiene el mismo aspecto. Es decir, nos encontramos con diferentes tipos de matriz extracelular. En corteza cerebral y en el núcleo magnocelular preóptico, se definen unas redes perineuronales de tipo clásico con el aspecto típico de red. Pero en los núcleos supraóptico y paraventricular, así como en el núcleo reticular talámico (Härtig et al., 1.994), el tipo de red que se define no tiene forma de red, posee un contorno difuso.

En el tiempo del estadio del día postnatal 21, se perfila ya el tipo de matriz extracelular de adulto. Las neuronas que van a tener redes perineuronales se definen así como las que no las tendrán. Ya que, como es sabido, no todas las células neuronales van a tener redes perineuronales. Las que las tengan debido a la estabilidad de la matriz extracelular en determinadas zonas es muy posible que las conserven en el futuro aunque no se sabe si las redes perineuronales que se detectan en determinado número de neuronas son siempre las mismas o puede aparecer con el incremento de actividad de una de estas células. En experimentos de estimulación fisiológica de los núcleo supraóptico y paraventricular se demuestra un incremento significativo de componentes de matriz extracelular, como tenascina. Que cuando termina dicha estimulación, aparece de nuevo la misma cantidad de marcaje de matriz extracelular (Theodosios et al., 1997). Y por tanto, puede que las que no las tienen, por estimulación fisiológica de estos núcleos podrían tenerlas.

Nuestros resultados coinciden con los de otros autores en el espacio de tiempo de aparición de las redes perineuronales. Aparecen durante la ontogenia, desde el día 14 hasta el 21 en el hipotálamo. Similar a lo que ocurre en otras áreas del sistema nervioso central, como en corteza (Härtig et al., 1994; 1995; 1999).

La matriz extracelular alcanza su estado adulto definitivo, aunque con menor marcaje, llegado el mes de vida. En esta edad se observa la matriz más definida, aunque todavía no como en la forma adulta. El marcaje de matriz extracelular general ha bajado mucho, pero se mantiene en determinadas zonas puntuales que se conservará durante toda la vida del animal. El marcaje de matriz extracelular en forma de redes perineuronales, tanto de tipo clásico en forma de red, como no clásicas de tipo difuso, son fácilmente identificables. La diferenciación

de las redes perineuronales está en parte programada en el desarrollo del tejido cerebral y que se mantiene en condiciones *in vitro* (Brückner y Grosche, 2001), y en parte definida y desarrollada por la actividad de la neurona que posea estas estructuras.

Luego, se podría decir que la formación de estas estructuras depende de dos factores, uno genético, y otro ambiental. El factor genético aporta la información necesaria de en qué área, en qué neurona y cuándo tienen que aparecer. Y el factor ambiental definirá su desarrollo y su funcionalidad definitiva dependiendo de la actividad fisiológica que asuma dicha neurona.

Se sabe que el núcleo supraóptico y paraventricular tienen mucha plasticidad, incluso después del desarrollo, conservándose en adulto. En estos núcleos, la matriz extracelular presenta un aspecto de redes perineuronales de tipo no clásico, sin red, que al estar tan juntas las neuronas, se fusiona con la red de la otra célula neuronal próxima. Es muy probable que presente esta textura debido a que es necesario conservar la plasticidad sináptica en este núcleo y esa sea la razón por la que no se define un tipo de red más definido morfológicamente como las redes perineuronales clásicas con forma de red. Es posible que sea ésta la razón por la que el marcaje de matriz extracelular con la aglutinina de la *Wisteria floribunda* sea negativa para los núcleos supraóptico y paraventricular. Sin embargo, se sabe que existe otras áreas con plasticidad como corteza cerebral e hipocampo, y en ellas sí se da este marcaje.

En las ratas viejas se producen pocos cambios en la matriz extracelular. La distribución es prácticamente la misma que en adultos. En los núcleos, se aprecia un ligero cambio. El marcaje que se mantiene, sin embargo, se hace menos difuso. Toma un aspecto

más definido aumentando su textura granulosa. Esto ocurre significativamente en el núcleo paraventricular, en la zona magnocelular, donde el marcaje de matriz extracelular alrededor de estas neuronas tiene un recubrimiento muy granuloso destacado. Esta apariencia se da con varios anticuerpos. También se puede destacar una bajada de marcaje generalizado en el tejido nervioso comparado con los núcleos estudiados, donde se mantiene.

Otros autores también han encontrado disminución de matriz extracelular en corteza cerebral. En particular un descenso en el marcaje de redes perineuronales (Hilbig et al., 2.002; Rollenhagen et al., 2.001). Estos autores han podido comprobar que existe una disminución de marcaje de la aglutinina de la *Wisteria floribunda* y HNK-1 asociada a la edad. Estos cambios, estarían asociados a la edad, pero según estos autores, estos efectos revierten bajo un ambiente enriquecido que les mantenga intelectualmente activos.

En nuestros experimentos observamos que el marcaje con esta aglutinina en el núcleo magnocelular preóptico experimentaba un cambio de pérdida de marcaje en el neuropilo rodeando a dicho núcleo. Las redes perineuronales de tipo clásico que aparecen, pasan de ser algo difuminadas a tener un aspecto definido como lámina de tinción sobre la neurona y con una textura granular. En los núcleos supraóptico y paraventricular que no se marcan con esta lectina, también aparece un descenso de marcaje en los alrededores de los núcleos, en el neuropilo. Y al igual que lo que ocurría con el núcleo magnocelular preóptico, el marcaje alrededor de la neurona se define formando una lámina de tinción y toma un aspecto granuloso.

En el núcleo supraóptico y paraventricular así como en el magnocelular preóptico, no se encuentran diferencias en la matriz extracelular durante la lactancia respecto a la situación

normal con ninguno de los anticuerpos probados. Sólo aparecieron diferencias en el marcaje con anticuerpos contra tenascina en la que se observa un incremento de marcaje en determinadas neuronas, tanto del núcleo supraóptico, como del núcleo paraventricular. Es posible que al activarse estas neuronas por la lactancia, puedan sintetizar más cantidad de tenascina los astrocitos que se sitúan próximos. Y ello redundaría en una protección ante el aumento de actividad de estas neuronas excitadas fisiológicamente. Y, de esta manera, podría preparar la matriz extracelular para los cambios que se producen en la activación. Estos cambios están descritos por otros autores. Aparece un incremento en la extensión de haces dendríticos (Perlmutter et al., 1.984); formación de sinapsis adicionales (Theodosis et al., 1.981; Hatton y Tweedle, 1.982; Perlmutter et al., 1.984; Tweedle y Hatton, 1.984; Chapman et al., 1.986); formación de uniones tipo GAP entre astrocitos (Cobbett y Hatton, 1.984; Hatton et al., 1.987); y cambios en la cantidad de recubrimiento del astrocito, en el soma neuronal, en dendritas o ambos. Y está demostrado que con la parada de estímulo se vuelve a la situación anterior (Hatton, 1.990; Theodosis y Poulain, 1.993).

Otros investigadores también han encontrado diferencias en la detección de tenascina en la matriz extracelular en el núcleo supraóptico (Singleton y Salm, 1.996). Detectando un aumento en la cantidad de tenascina en la matriz extracelular cuando se estimulaba fisiológicamente dicho núcleo con deshidratación y rehidratación. Los cambios acaecidos se ha comprobado que son reversibles cuando cesa la estimulación, corroborando los datos obtenidos por otros autores (Hatton, 1.990; Theodosis y Poulain, 1.993).

La tenascina es fundamental en la construcción de las redes perineuronales, pues se encarga de interaccionar con diversos componenets para construir la estructura tridimensional. En el trabajo de varios autores (Weber et al., 2.002), muestran que estas

estructuras se ven alteradas al quitarles la tenascina-R como componente. Las redes no se forman correctamente, lo que incide seguramente en la velocidad de conducción del impulso nervioso.

CONCLUSIONES

1º.- Hemos detectado la existencia de distintos componentes de matriz extracelular en los núcleos supraóptico, paraventricular y magnocelular preóptico en el hipotálamo de la rata, tales como: proteoglucanos condroitín 0, 4 y 6 sulfato, proteoglucano queratán sulfato, tenascina, y otras sustancias como radicales sulfato, terminales α -D-manosil y α -D-glucosil, así como terminales N-acetil D-galactosamina.

2º.- Estos componentes de matriz extracelular aparecen en gran cantidad en los primeros estadios postnatales.

3º.- Los componentes estudiados de matriz extracelular decrecen drásticamente en los primeros veintiún días postnatales en el neuropilo y después más lentamente en el resto de la vida del animal. Sin embargo, se conserva el marcaje observado en las neuronas de los núcleos supraópticos magnocelulares.

4º.- No existen redes perineuronales de tipo clásico en los núcleos supraóptico y paraventricular, aunque sí de tipo difuso.

5º.- La aparición de redes perineuronales de tipo clásico ocurre alrededor del día 21 postnatal únicamente en el núcleo magnocelular preóptico, y sólo con algunos componentes de matriz extracelular como con aglutinina de la *Wisteria floribunda* y proteoglucano 0 y 6 sulfato.

6º.- Las redes perineuronales, tanto clásicas, como difusas, toman aspecto maduro aproximadamente desde los treinta días postnatales.

7°.- Se apunta a una participación de la matriz extracelular en la funcionalidad diferenciada de estos núcleos. Las neuronas magnocelulares están rodeadas de gran cantidad de matriz extracelular, más que en el resto del neuropilo, lo que posibilita un alto grado de plasticidad.

8°.- Existe pérdida de componentes de matriz extracelular en el hipotálamo de la rata con la vejez. Esta pérdida es más acusada en el neuropilo, pero también es muy patente en espacios perineuronales de los núcleos supraóptico, paraventricular y magnocelular preóptico.

9°.- Existencia de plasticidad en componentes de matriz extracelular por activación fisiológica de los núcleos supraóptico y paraventricular en ratas lactantes al aparecer mayor cantidad de tenascina que en situación no lactante. No aparece este fenómeno con el resto de componentes de matriz extracelular estudiados.

10°.- Aparece colocalización incompleta de neuronas con redes perineuronales de tipo clásicas en el núcleo magnocelular preóptico y su contenido positivo en parvalbúmina.

11°.- No aparece especificidad en la síntesis de proteoglucanos por parte de neuronas o astrocitos. Todos los tipos de proteoglucanos condroitín sulfato estudiados han sido localizados ultraestructuralmente tanto en neuronas como en astrocitos. Si bien aparece más cantidad de proteoglucano condroitín 4 sulfato en astrocitos que en neuronas.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, I.; Brauer, K.; Arélin, C.; Härtig, W.; Fine, A.; Mäder, M.; Arendt, T.; Brückner, G.; (2001). Perineuronal nets in the Rhesus monkey and human basal forebrain including basal ganglia. *Neuroscience*, 108(2):285-298.
- Aghajanian, G.K.; Bloom, F.E.; (1.967). The formation of synaptic junctions in developing rat brain: a quantitative electron microscopic study. *Brain Research*, 6(4):716-727.
- Alzheimer, A.; (1.910). Beiträge zur Keuntris der patologischen Neuroglia und ihrer Beziehungen su den Abbanvorgängen in nervengewebe. Nissl's und Alzheimer's Hist u Histopath Arbeiten, p 3.
- Angaut, P.; Sotelo, C.; (1.973). The fine structure of the cerebellar central nuclei in the cat. II. Synaptic organization. *Experimental Brain Research*, 16(4):431-454.
- Angelov, D.N.; Walther, M.; Streppel, M.; Guntinas-Lichius, O.; Neiss, W.F.; Probstmeier, R.; Pesheva, P.; (1.998). Tenascin-R is antiadhesive for activated microglia that induce downregulation of the protein after peripheral nerve injury: a new role in neuronal protection. *The Journal of Neuroscience*, 18:6218-6229.
- Aquino, D.A.; Margolis, R.U.; Margolis, R.K.; (1.984). Immunocytochemical localization of a chondroitin sulfate proteoglycan in nervous tissue. I. Adult brain, retina, and peripheral nerve. *The Journal of Cell Biology*, 99(3):1117-1129.
- Aquino, D.A.; Margolis, R.U.; Margolis, R.K.; (1.984). Immunocytochemical localization of a chondroitin sulfate proteoglycan in nervous tissue. II. Studies in developing brain. *The Journal of Cell Biological*, 99(3):1.130-1.139.
- Armstrong, W.E.; Sladek, C.D.; Sladek, J.R. Jr.; (1.982). Characterization of noradrenergic control of vasopressin release by the organ-cultured rat hypothalamo-neurohypophyseal system. *Endocrinology*, 111(1):273-9.
- Armstrong, W.E.; (1.995). Paxinos. "The rat nervous system" 2ª Edition. Hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei. p. 377-390.
- Asberg, A.; Binkert, C.; Ruoslahti, E.; (1.995). The versican C-type lectin domain recognizes the adhesion protein tenascin-R. *Proceeding of National Academies of Sciences of USA*, 92:10590-10594.

- **Aspberg, A.; Miura, R.; Bourdoulous, S.; Shimonaka, M.; Heinegard, D.; Schachner, M.; Ruoslahti, M.; Yamaguchi, Y.;** (1.997). The C-type lectin domains of lecticans, a family of aggregating chondroitin sulfate proteoglycans bind tenascin-R by protein-protein interactions independent of carbohydrate moiety. *Proceeding National Academy of Sciences of USA*, 94(19):10116-10121.
- **Asher, R.; Bignami, A.;** (1.991). Localization of hyaluronate in primary glial cultures derived from newborn rat brain. *Experimental Cell Research*, 195:401-411.
- **Asou, H.; Brunngraber, E.G.; Delpech, B.;** (1.983). Localization of hyaluronectin in oligodendroglial cells. *The Journal of Neurochemistry*, 40(2):589-591.
- **Atoji, Y.; Hori, Y.; Sugimura, M.; Suzuki, Y.;** (1.989). Extracellular matrix of the superior olivary nuclei in the dog. *Journal of Neurocytology*, 18:599-610.
- **Auderheide, E.; Ekblom, P.;** (1.988). Tenascin during gut development: appearance in the interactions. *Journal of Cell Biology*, 107(6 Pt 1):2341-2349.
- **Bartsch, S.; Bartsch, U.; Dorries, U.; Faissner, A.; Weller, A.; Ekblom, P.; Schachner, M.;** (1.992). Expression of tenascin in the developing and adult cerebellar cortex. *The Journal of Neurosciences*, 12(3):736-749.
- **Beck, P.D.; Pospichal, M.W.; Kaas, J.H.;** (1.996). Topography, architecture, and connections of somatosensory cortex in opossums: evidence for five somatosensory areas. *The Journal of Comparative Neurology*, 366(1):109-133.
- **Becker, T.; Becker, C.G.; Niemann, U.; Naujoks-Manteuffel, C.; Bartsch, U.; Schachner, M.; Roth, G.;** (1.995). Immunohistological localization of tenascin-C in the developing and regenerating retinotectal system of two amphibian species. *The Journal of Comparative Neurology*, 360(4):643-657.
- **Belichenko, P.V.; Miklossy, J.; Celio, M.R.;** (1.997). HIV-I induced destruction of neocortical extracellular matrix components in AIDS victims. *Neurobiology Disease*, 4(3-4):301-310.
- **Belichenko, P.V.; Miklossy, J.; Celio, M.R.;** (1.999). HIV-I induced destruction of neocortical extracellular matrix components in AIDS victims. *Neurobiology Disease*, 4:301-310.
- **Belichenko, P.V.; Miklossy, J.; Belser, B.; Budka, H.; Celio, M.R.;** (1999). Early destruction of the extracellular matrix around parvalbumin-immunoreactive interneurons in Creutzfeld-Jakob disease. *Neurobiology of Disease*, 6:269-279.

- **Belloni, G.B.;** (1.933). Del reticolo diffuso-pericellulare dei centri nervosi nell'uomo. Riv. Neurol. 6:5-44.
- **Beneyto, M.; Rueda, J.; Merchán, J.A.; Prieto, J.J.;** (1.999). Specific staining of nonpyramidal cell populations of the cerebral cortex by lectin cytochemistry on semithin sections. Brain Research Bulletin, 49(4):251-262.
- **Bertolotto, A.; Palmucci, L.; Gagliano, A.; Mongini, T.; Tarone, G.;** (1.986). Immunohistochemical localization of chondroitin sulfate in normal and pathological human muscle. The Journal of Neurological Sciences, 73(3):233-244.
- **Bertolotto, A.; Rocca, G.; Schiffer, D.;** (1.990). Chondroitin 4-sulfate proteoglycan forms an extracellular network in human and rat central nervous system. Journal of Neurological Sciences, 100:113-123.
- **Bertolotto, A.; Rocca, G.; Canavese, G.; Migheli, A.; Schiffer, D.;** (1.991). Chondroitin sulfate proteoglycan surround a subset of human and rat CNS neurons. Journal of Neuroscience Research, 29:225-234.
- **Bertolotto, A.; Manzardo, E.; Iudicello, M.; Lovisetto, C.; Riccio, A.;** (1.995). disappearance of the *Vicia villosa*-positivity from the perineuronal net containing chondroitin proteoglycan after chondroitinase digestion. Brain Research, 673(2):344-348.
- **Bertolotto, A.; Manzardo, E.; Guglielmone, R.;** (1.996). Immunohistochemical mapping of perineuronal nets containing chondroitin unsulfate proteoglycan in the rat central nervous system. Cell Tissue Research, 283:283-295.
- **Besta, C.;** (1.909). Il reticolo periferico della cellula nervosa in condizioni normali e patologiche. Riv. Patol. Nerv. Ment 14(12).
- **Besta, C.;** (1.910). Sul reticolo periferico della cellula nervosa nei mammiferi. Internat. Monatsschr f anat. U Phys, 27:402-443.
- **Besta, C.;** (1.911). Sul modo di comportarsi del reticolo pericellulare in alcuni processi patologici del tessuto nervoso. Riv. Patol. Nerv. Ment., 16:604-620.
- **Besta, C.;** (1.932). Sulle propaggini endocellulari del rivestimento periferico della cellula nervosa. Boll. Soc. It. Biol. Sper., 7:1-3.
- **Besta, C.;** (1.932). Su un particolare della struttura della corteccia del cervelletto. Riv. Neurol., 5:3-8.
- **Bethe, A.;** (1.900). Ueber die neurofibrillen in den ganglienzellen von wirbelthieren und ihre beziehungen zu den golginetzen. Arch. Mikrosk. Anat., 55:513-558.

- **Bielchowsky, M.;** (1928). Nervengewebe. In W. von Möllendorf (Ed.), *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Vol.4 (1), Springer, Berlin, pp 93-96.
- **Bignami, A.; Dahl, D.;** (1989). Vimentin-GFAP transition in primary dissociated cultures of rat embryo spinal cord. *International Journal Development Neuroscience*, 7(4):343-357.
- **Bignami, A.; Asher, R.;** (1992). Some observations on the localization of hyaluronic acid in adult, newborn and embryonal rat brain. *International Journal Development Neuroscience*, 10(1):45-57.
- **Bignami, A.; Asher, R.; Perides, G.;** (1992). Co-localization of hyaluronic acid and chondroitin sulfate proteoglycan in rat cerebral cortex. *Brain Research*, 579:173-177.
- **Bignami, A.; Asher, R.; Perides, G.; Rahemtulla, F.;** (1992). The extracellular matrix of cerebral gray matter: Golgi's pericellular net and Nissl's nervösen grau revisited. *International Journal of Development Neuroscience*, 10(4):291-299.
- **Bignami, A.; Perides, G.; Asher, R.; Dahl, D.;** (1992). The astrocyte-extracellular matrix complex in CNS myelinated tracts: a comparative study on the distribution of hyaluronate in rat, goldfish and lamprey. *Journal of Neurocytology*, 21:604-613.
- **Bignami, A.; Perides, G.; Rahemtulla, F.;** (1993). Versican, a hyaluronate-binding proteoglycan of embryonal precartilaginous mesenchyma, is mainly expressed postnatally in rat brain. *Journal of Neuroscience Research*, 34:97-106.
- **Bignami, A.; Hosley, M.; Dahl, D.;** (1993). Hyaluronic acid and hyaluronic acid-binding proteins in brain extracellular matrix. Review article. *Anatomy and Embryology*, 188:419-433.
- **Blümcke, I.; Eggl, P.; Celio, M.R.;** (1995). Relationship between astrocytic processes and "Perineuronal Nets" in rat neocortex. *Glia*, 15:131-140.
- **Bodega, G.; Gianonatti, C.; Suárez, I.; Fernández, B.;** (1985). Perineuronal glial nets in the rat spinal cord. A Golgi study. *Arch. Histol. Jap.*, 48(5):505-510.
- **Bonfanti, L.; Olive, S.; Poulain, D.A.; Theodosis, D.T.;** (1992). Mapping of the distribution of polysialylated neural cell adhesion molecule throughout the central nervous system of the adult rat: an immunohistochemical study. *Neuroscience*, 74:619-623.
- **Bonfanti, L.; Poulain, D.A.; Theodosis, D.T.;** (1993). Putative factors implicated in the structural plasticity of the hypothalamo-neurohypophysial system. *Regulation Peptides*, 45(1-2):165-70.

- Borsi, L.; Carnemolla, B.; Nicolo, G.; Spina, B.; Tanara, G.; Zardi, L.; (1.992). Expression of different tenascin isoform in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues. *International Journal of Cancer*, 52(5):688-692.
- Bourdon, M.A.; Ruhoslahti, E.; (1.989). Tenascin mediates cell attachment through and RGD-dependent receptor. *Journal of Cell Biology*, 108(3):1.149-1.155.
- Boyd, W.C.; (1.963). The lectins: their present status. *Voxsang*, 8:1-32.
- Brauer, K.; Werner, L.; Leibnitz, L.; (1.982). Perineuronal nets of glia. *Journal Hirnforsch*, 23:701-708.
- Brauer, K.; Brückner, G.; Leibnitz, L.; Werner, L.; (1.984). Structural and cytochemical features of perineuronal glial nets in the rat brain. *Acta Histochemistry*, 74:53-60.
- Brauer, K.; Härtig, W.; Brückner, G.; (1.993). Distribution of parvalbumin-containing neurons and lectin-binding perineuronal nets in the rat basal forebrain. *Brain Research*, 631:167-170.
- Brauer, K.; Härtig, W.; Fritschy, J.M.; Brückner, G.; Bigl, V.; (1.995). Co-occurrence of perineuronal nets with GABA_A receptor alpha 1 subunit-immunoreactive neurones in the rat septal region. *NeuroReport* 6:733-736.
- Brauer, K.; Holzer, M.; Brückner, G.; Tremere, L.; Rasmusson, D.D.; Poethke, R.; Arendt, T.; Härtig, W.; (1.999). Two distinct populations of cholinergic neurons in the septum of raccoon (*Procyon lotor*): Evidence for a separate subset in the lateral septum. *The Journal of Comparative Neurology*, 412:112-122.
- Brückner, G.; Gogala, M.; Zei, M.; Biesold, D.; (1.984). Histochemical detection of anionic components in the cephalopod brain. *Acta Histochemica*, 74:91-102.
- Brückner, G.; Delpech, B.; Delpech, A.; Girard, N.; (1.990). Concentration of hyaluronectin and anionic glucoconjugates in perineuronal glial cell processes at GABAergic synapses of rat cerebellum. *Acta Histochemica*, Suppl. 38, S. 161-165.
- Brückner, G.; Brauer, K.; Härtig, W.; Wolff, J.R.; Rickmann, M.J.; Derouiche, A.; Delpech, B.; Girard, N.; Oertel, W.H.; Reichenbach, A.; (1.993). Glia-associated polyanionic perineuronal nets –a widely distributed form of neuronal microenvironment in the rat brain. *Glia*, 8:183-200.
- Brückner, G.; Brauer, K.; Härtig, W.; Wolff, J.R.; Rickmann, M.J.; Derouiche, A.; Delpech, B.; Girard, N.; Oertel, W.H.; Reinchenback, A.; (1.993). Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia*, 8:183-200.

- Brückner, G.; Seeger, G.; Brauer, K.; Härtig, W.; Kacza, J.; Bigl, V.; (1.994). Cortical areas are revealed by distribution patterns of proteoglycan components and parvalbumin in the mongolian gerbil and rat. *Brain Research*, 658:67-86.
- Brückner, G.; Schütz, A.; Härtig, W.; Brauer, K.; Paulke, B-R.; Bigl, V.; (1.994). Projection of non-cholinergic basal forebrain neurons ensheathed with perineuronal net to rat mesocortex. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 8:11-18.
- Brückner, G.; Bringmann, A.; Köppe, G.; Härtig, W.; Brauer, K.; (1.996). *In vivo* and *in vitro* labelling of perineuronal nets in rat brain. *Brain Research*, 720:84-92.
- Brückner, G.; Härtig, W.; Kacza, J.; Seeger, J.; Welt, K.; Brauer, K.; (1.996). Extracellular matrix organization in various regions of rat brain grey matter. *Journal of Neurocytology*, 25: 333- 346.
- Brückner, G.; Härtig, W.; Seeger, J.; Rübsamen, R.; Reimer, K.; Brauer, K.; (1.998). Cortical perineuronal nets in the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*): a distribution pattern contrasting with that shown in placental mammals. *Anatomy and Embryology*, 197:249-262.
- Brückner, G.; Bringmann, A.; Härtig, W.; Köppe, G.; Delpech, B.; Brauer, K.; (1.998). Acute and long-lasting changes in extracellular-matrix chondroitin sulphate proteoglycans induced by injection of chondroitinase ABC in the adult rat brain. *Experimental Brain Research*, 121:300-310.
- Brückner, G.; Hausen, D.; Härtig, W.; Drlicek, M.; Arendt, T.; Brauer, K.; (1.999). Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 92(3):791-805.
- Brückner, G.; Grosche, J.; Schmidt, S.; Härtig, W.; Margolis, R.U.; Delpech, B.; Seindenbecher, C.I.; Czaniera, R.; Schachner, M.; (2.000). Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. *The Journal of Comparative Neurology*, 428(4):616-629.
- Brückner, G.; Grosche, J.; (2.001). Perineuronal nets show intrinsic patterns of extracellular matrix differentiation in organotypic slice cultures. *Experimental Brain Research*, 137:83-93.
- Bukalo, O.; Schachner, M.; Dityatev, A.; (2.001). Modification of extracellular matrix by enzymatic removal of chondroitin sulfate and by lack of tenascin-R differentially affects several forms of synaptic plasticity in the hippocampus. *Neuroscience*, 104(2):359-369.
- Carlson, S.S.; Hockfield, S.; (1.996). Central nervous system. In: Comper WD (ed) *Tissue function*.

(Extracellular matrix, vol1) Harwood Academic, Amsterdam, 1-23.

- **Carnemolla, B.; Borsi, L.; Bannikov, G.; Troyanovsky, S.; Zardi, L.;** (1992). comparison of human. tenascin expression in normal, simian-virus-40-transformed and tumor-derived cell lines. *European Journal of Biochemistry*, 205(2):561-567.
- **Carpenter, M.B.; Sutin, J.** *Neuroanatomía humana*. Sexta edición. Editorial "El Ateneo", 1.990.
- **Casteluci, M.; Classen-Linke, I.; Muhlhauser, J.; Kaufmann, P.; Zardi, L.; Chiquet-Ehrismann, R.;** (1991). The human placenta: a model for tenascin expression. *Histochemistry*, 95(5):449-58.
- **Castillo, G.M.; Nho, C.; Cummings, J.; Wight, T.N.; Snow, A.D.;** (1997). Perlecan binds to the beta-amyloid proteins (A beta) of Alzheimer's disease, accelerates a beta fibril formation, and maintains a beta fibril stability. *Journal of Neurochemistry*, 69(6):2752-2465.
- **Celio, M.R.;** (1986). Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science*, 231(4741):995-997.
- **Celio, M.R.; Baier, W.; Schärer, L.; De Viragh, P.A.; Gerdoy, CH;** (1988). Monoclonal antibodies directed against the calcium binding protein parvalbumin. *Cell Calcium*, 9:81-86.
- **Celio, M.R.;** (1990). Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience*, 35(2):375-475.
- **Celio, M.R.;** (1993). Perineuronal nets of extracellular matrix around parvalbumin-containig neurons of the hippocampus. *Hippocampus*, Vol.3, special issue, eds. R. Nitsch and T.G. Ohm. 55-60.
- **Celio, R.M.; Chiquet-Ehrisman, R.;** (1993). Perineuronal nets around cortical interneurons expressing parvalbumin are rich in tenascin. *Neuroscience Letters*, 162:137-140.
- **Celio, M.R.; Rathjen, F.G.;** (1993). Restrictin occurs in perineuronal nets of the adult rat brain. *Society for Neuroscience, Abstracts Vol.19, part 1.*
- **Celio, R.M.; Blümcke, I.;** (1994). Perineuronal nets -a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system-. *Brain Research Reviews*, 19:128-145.
- **Celio, M.R.; Spreafico, R.; DeBiasi, S.; Vitellaro-Zuccarello;** (1998). Perineuronal nets: past and present. *Trends in Neuroscience*, 21(12):510-515.
- **Cervós-Navarro, J.; Turker, T.; Worthmann, F.;** (1994). Morphology of non-vascular intracerebral fluid spaces. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*, 60:147-150.



- Clement, J.; Solas, M.T.; Fernández, B.; (1.995). Estudio de astrocitos y redes perineuronales en el núcleo supraóptico y paraventricular del hipotálamo de rata. *Revista de Neurología*, 25:563.
- Clement, J.; Díaz, D.; García, M.L.; Solas, M.T.; Fernández, B.; (1.996). Estudio morfológico de redes perineuronales en el núcleo supraóptico y paraventricular del hipotálamo de rata. *Boletín Real Sociedad de Historia Natural* (125 Aniversario):28-30.
- Clement, J.; Díaz, D.; García, M.L.; Solas, M.T.; Fernández, B.; (1.997). Estudio citoquímico de la matriz extracelular hipotalámica. *Revista de Neurología*, 25(147):1750.
- Clement, J.; Díaz, D.; Bañuelos, M.; Solas, M.T.; Fernández, B.; (2.000). Estudios citoquímicos de las redes perineuronales en los núcleos magnocelulares del hipotálamo de la rata. *Boletín de la Real Sociedad de Historia Natural*, 92(1-2):147-149.
- Cobbett, P.; Hatton, G.I.; (1.984). Dye-cupling in hypothalamic slices: Dependence on *in vivo* hydration state and osmolality of incubation medium. *Journal of Neuroscience*, 4:3034-3038.
- Courel, M.N.; Marret, S.; Girard, N.; Chauzy, C.; Olivier, A.; Bertrand, P.; Delpech, A.; Laquerrière, A.; Asou, H.; Delpech, B.; (1.998). Hyaluronectin is produced by oligodendrocytes and Schwann cells *in vitro*. *The Journal of Neurocytology*, 27(1):27-32.
- Couchman, JR.; Caterson, B.; Christner, JE.; Baker, JR.; (1.984). Mapping by monoclonal antibody detection of glycosaminoglycans in connective tissues. *Nature*, 307(5952):650-652.
- Crossin, K.L.; (1.994). Functional role of cytotactin/tenascin in morphogenesis: a modest proposal. *Perspectives in Development Neurobiology*, 2(1):21-32.
- Crutcher, K.A.; Anderton, B.H.; Barger, S.W.; Ohm, T.G.; Snow, A.D.; (1.993). Cellular and molecular pathology in Alzheimer's disease. *Hippocampus*, 3 Spec:271-287.
- Cs-Szabo, G.; Roughley, P.J.; Plaas, A.H.; Glant, T.T.; (1.995). Large and small proteoglycans of osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage. *Arthritis Rheum*, 38(5):660-668.
- Chapman, D.B.; Theodosis, D.T.; Montagnese, C.; Poulain, D.A.; Morris, J.F.; (1.986). Osmotic stimulation causes structural plasticity of neurone-glia relationships of the oxytocin but not vasopressin secreting neurones in the hypothalamic supraoptic nucleus. *Neuroscience*, 17:679-686.
- Chiquet-Ehrismann, R.; Mackie, E.J.; Pearson, C.A.; Sakakura, T.; (1.986). Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell*, 47(1):131-139.

- D'Arcangelo, G.; Miao, G.G.; Chen, S.C.; Soares, H.D.; Morgan, J.I.; Curran, T.; (1.995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*, 374(6524):719-23.
- De Lecea, L.; Criado, J.R.; Próspero-García, O.; Gautvik, K.M.; schweitzer, P.; Danielson, P.E.; dunlop, C.L.; Siggins, G.R.; Henriksen, S.J.; Sutcliffe, J.G.; (1.996). A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature*, 16:381(6.579):242-245.
- Delpech, A.; Girard, N.; Delpech, B.; (1.982). Localization of hyaluronectin in the nervous system. *Brain Research*, 245:251-257.
- Delpech, B.; Bertrand, P.; Girard, N.; Delpech, A.; (1.986). Specificity of hyaluronectin binding to hyaluronic acid. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 34(7):963-964.
- Delpech, B.; Delpech, A.; Brückner, G.; Girard, N.; Maingonnat, C.; (1.989). Hyaluronan and hyaluronectin in the nervous system. *The biology of hyalurona*. CIBA Foundation Symposium, Vol. 143, John Wiley and Chichester, p.208-232
- Derouiche, A.; Frotscher, M.; (1.991). Astroglial processes around identified glutamatergic synapses contain glutamine synthetase: evidence for transmitter degradation. *Brain Research*, 552:346-350.
- Derouiche, A.; Härtig, W.; Brauer, K.; Brückner, G.; (1.996). Spatial relationship of lectin-labelled extracellular matrix and glutamine synthetase-immunoreactive astrocytes in rat cortical forebrain regions. *Journal of Anatomy*, 189:363-372.
- Deyoe, E.A.; Hockfield, S.; Garren, H.; Van Essen, D.C.; (1.990). Antibody labeling of functional subdivisions in visual cortex: Cat-301 immunoreactivity in striate and extrastriate cortex of the macaque monkey. *Visual Neuroscience*, 5(1):67-81.
- Dóczi, T.; (1.993). Volume regulation of the brain tissue—a survey. *Acta Neurochir (Wier)*, 121(1-2):1-8.
- Donaggio, A.; (1.896). *Riv. Sper. Freniatria*, 22:862-866.
- Donaggio, A.; (1.898). Nuove osservazioni sulla struttura della cellula nervosa. *Riv. Sper. Frniatria*, 24:772-778.
- Donaggio, A.; (1.900). Brevi osservazioni su alcuni rapporti frarete periferica e tessuto circumambiente e sulla coesistenza delle fibrille di Bethe e della rete febrillare nelle cellule nervose dei vertebrati. *Riv. Sper. Freniatria*, 27:127-131.
- Donaggio, A.; (1.901). Sulla presenza di sottili fibrille tra le maglie del reticolo periferico della cellula

nervosa. *Bibliographie Anatomique*, 4:166.

- **Donaggio, A.**; (1.903). Una questione istofisiologica riguardante la trasmissione nervosa per contatto. *Riv. Sper. Freniatria*, 29:311-315.

- **Donaggio, A.**; (1.931). XXXV Congès des Alien et Neur de France, Bordeaux.

- **Eggli, P.S.; Graber, W.**; (1.996). Ultrastructural association of hyaluronan with rat unmyelinated nerve fibres. *Journal of Neurocytology*, 25:79-87.

- **Engel, M.; Maurel, P.; Margolis, R.U.; Margolis, R.K.**; (1.996). Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. I. Cellular sites of synthesis of neurocan and phosphacan. *The Journal of Comparative Neurology*, 366(1):34-43.

- **Erickson, H.P.; Boudon, M.A.**; (1.989). Tenascin: and extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors. *Annual Review Cell Biology*, 5:71-92.

- **Erickson, H.P.**; (1.993). Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. *Current Opinion Cell Biology*, 5(5):867-876.

- **Faissner, A.; Kruse, J.**; (1.990). J1/tenascin is a repulsive substrate for central nervous system neurons. *Neuron*, 5(5): 627-637.

- **Faissner, A.; Clement, A.; Lochter, A.; Streit, A.; Mandl, C.; Schachner, M.**; (1.994). Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promotng properties. *The Journal of Cell Biology*, 126(3):783-799.

- **Faissner, A.; Steindler, D.**; (1.995). Boundaries and inhibitory molecules in developing neural tissues. *Glia*, 13(4):233-254.

- **Ffrench-Constant, C.; Miller, R.H.; Kruse, J.; Schachner, M.; Raff, M.C.**; (1.986). Molecular specialization of astrocyte processes at nodes of Ranvier in rat optic nerve. *Journal of Cell Biology*, 102(3):844-852.

- **Fillit, H.; Leveugle, B.**; (1.995). Disorders of the extracellular matrix and the pathogenesis of senile dementia of the Alzheimer's type. *Laboratory of Investigation*, 72(3):249-253.

- **Flaumenhaft, R.; Rifkin, D.B.**; (1.991). Extracellular matrix regulation of growth factor and protease activity. *Current Opinion in Cell Biology*, 3(5):817-823.

- **Friedlander, D.R.; Milev, P.; Karthikeyan, L.; Margolis, R.K.; Margolis, R.U.; Grumet, M.**; (1.994).

The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *The Journal of Cell Biology*, 125(3):669-680.

- **Fryer, H.J.; Kelly, G.M.; Molinaro, L.; Hockfield, S.**; (1992). The high molecular weight Cat-301 chondroitin sulfate proteoglycan from brain is related to the large aggregating proteoglycan from cartilage aggrecan. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(14):9874-9883.

- **Fujita, S.C.; Tada, Y.; Murakami, F.; Hyashi, M.; Matsumura, M.**; (1989). Glycosaminoglycan-related epitopes surrounding different subsets of mammalian central neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 7:117-130.

- **Fujita, S.C.; Kudo, J.**; (1992). A novel member to the family of perineuronal antigens associated with subpopulations of central neurons in the rat. *Experimental Brain Research*, 88:345-354.

- **Fukatsu, T.; Sobue, M.; Nagasaka, T.; Ohiwa, N.; Fukata, S.; Nakasima, N.; Takauchi, J.**; (1988). Immunohistochemical localization of chondroitin sulphate and dermatan sulphate proteoglycans in tumour tissues. *Bromatology Journal of Cancer*, 57(1):74-78.

- **Fuxe, K.; Chadi, G.; Tinner, B.; Agnati, L.F.; Pettersson, R.; David, G.**; (1994). On the regional distribution of heparan sulfate proteoglycan immunoreactivity in the rat brain. *Brain Research*, 636:131-138.

- **Gallo, V.; Bertolotto, A.; Levi, G.**; (1987). The proteoglycan sulfate proteoglycan is present in a subpopulation of cultured astrocytes and their precursors. *Development in Biology*, 123:282-285.

- **Gallo, V.; Bertolotto, A.**; (1990). Extracellular matrix of cultured glial cells, selective expression of chondroitin 4-sulfate by type 2 astrocytes and their progenitors. *Experimental Cell Research*, 187:211-223.

- **Gan, L.; Kaczmarek, L.K.**; (1998). When, where, and how much? Expression of the Kv3.1 potassium channel in high-frequency firing neurons. *The Journal of Neurobiology*, 37(1):69-79.

- **Geisert, E.E. Jr.; Bidanset, D.J.**; (1993). A central nervous system keratan sulfate proteoglycan: localization to boundaries in the neonatal rat brain. *Brain Reseachr Development Brain Research*, 75(2):163-173.

- **Glant, T.T.; Mikecz, K.; Poole, A.R.**; (1986). Monoclonal antibodies to different protein-related epitopes of human articular cartilage proteoglycans. *Biochemistry Journal*, 234(1):31-41.

- **Glant, T.T.; Mikecz, K.; Roughley, P.J.; Buzas, E.; Poole, A.R.**; (1986). Age-related changes in protein-related epitopes of human articular-cartilage proteoglycans, 236(1):71-75.

- **Goedert, M.; Spillantini, M.G.; Jakes, R.; Crowther, R.A.; Vanmechelen, E.; Probst, A.; Gotz, J.; Burki, K.; Cohen, P.;** (1.995). Molecular dissection of the paired helical filament. *Neurobiology of Aging*, 16(3):325-334.
- **Goedert, M.; Jakes, R.; Spillantini, M.G.; Hasegawa, M.; Smith, M.J.; Crowther, R.A.;** (1.996). Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filament induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* 383:550-553.
- **Golgi, C.;** (1.873). Sulla struttura della sostanza grigia del cervello. *Gazzetta Medica Italiana-Lombardia*, 6:244-246.
- **Golgi, C.;** (1.882). Nervoso (sistema). In: *Enciclopedia Medica Vallardi*, 3(1):93-122.
- **Golgi, C.;** (1.893). Intorno all'origine del quarto nervo cerebrale e una questione isto-fisiologica che a questo argomento si collega. *Rendiconto della Reale Accademia dei Lincei* (21 maggio), 2:443-450.
- **Golgi, C.;** (1.898). Intorno alla struttura delle cellule nervose. *Bolletino Società Medico-Chirurgica di Pavia*, 1:1-16.
- **Grumet, M.; Hofmann, S.; Crossin, K.L.; Edelman, G.;** (1.985). Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissue that mediates glia-neuron interaction. *Proceeding National Academy of Sciences of USA*, 82:8075-8079.
- **Grumet, M.; Milev, P.; Sakurai, T.; Karthikeyan, L.; Bourdon, M.; Margolis, R.K.; Maroglis, R.U.;** (1.994). Interactions with tenascin and differential effects on cell adhesion of neurocan and phosphacan, two major chondroitin sulfate proteoglycans of nervous tissue. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(16):12142-12146.
- **Guentchev, M.; Groschup, M.H.; Kordek, R.; Liberski, P.P.; Budka, H.;** (1.998). Severe, early and selective loss of a subpopulation of GABAergic inhibitory neurons in experimental transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Pathology*, 8:615-623.
- **Guentchev, M.; Wanschitz, J.; Voigtänder, T.; Flicker, H.; Budka, H.;** (1.999). Selective neuronal vulnerability in human prion diseases. Fatal familial insomnia differs from other types of prion diseases. *American Journal of Pathology*, 155(5):1453-1457.
- **Guimarães, A.; Zaremba, S.; Hoskfield, S.;** (1.990). Molecular and morphological changes in the cat lateral geniculate nucleus and visual cortex induced by visual deprivation are revealed by monoclonal antibodies Cat-

304 and Cat-301. *The Journal of Neuroscience*, 10(9): 3014-3024.

- Hagihara, K.; Miura, R.; Kosaki, R.; Berglund, E.; Ranscht, B.; Yamaguchi, Y.; (1999). Immunohistochemical evidence for the brevican-tenascin-R interaction: Colocalization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 410:256-246.
- Hall, H.; Liu, L.; Schachner, M.; Schmitz, B.; (1993). The L2/HNK-1 carbohydrate mediates adhesion of neural cells to laminin. *European Journal of Neuroscience*, 5:3442.
- Hall, H.; Vorherr, T.; Schachner, M.; (1995). Characterization of a 21 amino acid peptide sequence of the laminin G2 domain that is involved in HNK-1 carbohydrate binding and cell adhesion. *Glycobiology*, 5:435-441.
- Hall, J.E.; Guyton, A.C.; Brands, M.W.; (1996). Pressure-volume regulation in hypertension. *Kidney International Supplement*, 55:S35-41.
- Hale, C.W.; (1946). Histochemical demonstration of acid polysaccharides in animal tissues. *Nature* 157:802.
- Hardingham, T.E.; Fosang, A.J.; (1992). Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB Journal*, 6(3):861-70.
- Härtig, W.; Brauer, K.; Brückner, G.; (1992). "Wisteria floribunda" agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *NeuroReport*, 3:869-872.
- Härtig, W.; Brauer, K.; Bigl, V.; Brückner, G.; (1994). Chondroitin sulfate proteoglycan-immunoreactivity of lectin-labeled perineuronal nets around parvalbumin-containing neurons. *Brain Research*, 635:307-311.
- Härtig, W.; Brückner, G.; Brauer, K.; Schmidt, C.; Bigl, V.; (1995). Allocation of perineuronal nets and parvalbumin, calbindin - D28k - and glutamic acid decarboxylase-immunoreactivity in the amygdala of the rhesus monkey. *Brain Research*, 698:265-269.
- Härtig, W.; Brückner, G.; Holzer, M.; Brauer, K.; Bigl, V.; (1995). Digoxigenylated primary antibodies for sensitive dual-peroxidase labelling of neural markers. *Histochemistry Cell Biology*, 104:467-472.
- Härtig, W.; Derouiche, A.; Welt, K.; Brauer, K.; Grosche, J.; Mäder, M.; Reinchenbach, A.; Brückner, G.; (1999). Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain Research*, 842:15-29.

- Härtig, W.; Singer, A.; Grosche, J.; Brauer, Ottersen, O.P.; Brückner, G.; (2.001). Perineuronal nets in the rat medial nucleus of the trapezoid body surround neurons immunoreactive for various amino acids, calcium-binding proteins and the potassium channel subunit Kv3.1b. *Brain Research* 899:123-133.
- Härtig, W.; Klein, C.; Brauer, K.; Schüppel, K-F.; Arendt, T.; Bigl, V.; Brückner, G.; (2.001). Hyperphosphorylated protein tau is restricted to neurons devoid of perineuronal nets in the cortex of aged bison. *Neurobiology of Aging*, 22:25-33.
- Hascall, V.C.; Glant, T.T.; (1.987). Proteoglycan epitopes as potential markers of normal and pathologic cartilage metabolism. *Arthritis Rheum*, 30(5):586-588.
- Hatton, G.; Tweedle, C.D.; (1.982). Magnocellular neuropeptidergic neurons in hypothalamus: Increases in membrane apposition and number of specialized synapses from pregnancy to lactation. *Brain Research Bulletin*, 8:197-504.
- Hatton, G.; (1.990). Emerging concepts of structure-function dynamics in adult brain: The hypothalamo-neurohypophyseal system. *Progress in Neurobiology*, 34:437-504.
- Hatton, G.I.; Tweedle, C.D.; (1.982). Magnocellular neuropeptidergic neurons in hypothalamus: increases in membrane apposition and number of specialized synapses from pregnancy to lactation. *Brain Research Bulletin*, 8(2):197-204.
- Haunsø, A.; Celio M.R.; Margolis, R.K.; Menoud, P.A.; (1.999). Phosphacan immunoreactivity is associated with perineuronal nets around parvalbumin-expressing neurones. *Brain Research*, 834:219-222.
- Haunsø, A.; Ibrahim, M.; Bartsch, U.; Letiembre, M.; Celio, M.R.; Menoud, P.A.; (2.000). Morphology of perineuronal nets in tenascin-R and parvalbumin single and double knockout mice. *Brain Research*, 864:142-145.
- Hausen, D.; Brückner, G.; Drlicek, M.; Härtig, W.; Brauer, K.; Bigl, V.; (1.996). Pyramidal cells ensheathed by perineuronal nets in human motor and somatosensory cortex. *NeuroReport*, 7:1.725-1.729.
- Held, H.; (1.895). Beiträge zur Structur der Nervenzelle und ihrer Fortsätze. *Arch. Physiol. Anat. Abtheil*, 1:396-416.
- Held, H.; (1.902). Ueber den bau der grauen und weissen substanz. *Arch. f Anat. Physiol. (Anat. Abtl.)* V:189-224.
- Hendry, S.H.; Jones, E.G.; Hockfield, S.; McKay, R.D.; (1.988). Neuronal populations stained with the

monoclonal antibody Cat-301 in the mammalian cerebral cortex and thalamus. *Journal of Neuroscience*, 8(2):518-542.

- **Hilbig, H.; Bidmon, H.-J.; Steingrüber, S.; Reinke, H.; Dinse, H.R.**; (2002). Enriched environmental conditions reverse age-dependent gliosis and losses of neurofilaments and extracellular matrix components but do not alter lipofuscin accumulation in the hindlimb area of the aging rat brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 23:199-209.

- **Hitomi, S.; Su, W.D.; Hong, L.J.; Ohtsuka, A.; Murakami, T.**; (1997). Perineuronal sulfated proteoglycans and cell surface glycoproteins in the visual cortex of adult and newborn cats. *Acta Medica Okayama*, 51(6):295-299.

- **Hobohn, C.; Härtig, W.; Brauer, K.; Brückner, G.**; (1998). Low expression of extracellular matrix components in rat brain stem regions containing modulatory aminergic neurons. *The Journal of Chemical Neuroanatomy*, 15:135-142.

- **Hockfield, S.; McKay, R.D.**; (1983). A surface antigen expressed by a subset of neurons in the vertebrate central nervous system. *Proceeding of National Academy of Sciences of USA*, 80(18):5758-5761.

- **Hockfield, S.; McKay, R.**; (1983). Monoclonal antibodies demonstrate the organization of axons in the leech. *The Journal of Neuroscience*, 3(2):369-75.

- **Hockfield, S.; Kalb, R.G.; Zaremba, S.; Fryer, H.**; (1990). Expression of neural proteoglycans correlates with the acquisition of mature neuronal properties in the mammalian brain. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Volume 50:505-514.

- **Hockfield, S.; Kalb, R.G.**; (1993). Activity-dependent structural changes during neuronal development. *Current Opinion in Neurobiology*, 3(1):87-92.

- **Hoffman, S.; Edelman, G.M.**; (1987). A proteoglycan with HNK-1 antigenic determinants is a neuron-associated ligand for cytotoxicity. *Proceeding of National Academy of Science of USA*, 84(8):2523-2527.

- **Hong, L.J.; Mubarak, W.A.E.; Sunami, Y.; Murakami, S.; Fuyama, Y.; Ohtsuka, A.; Murakami, T.**; (2000). Enhanced visualization of weak colloidal iron signals with Bodian's protein silver for demonstration of perineuronal nets of proteoglycans in the central nervous system. *Archives of Histology and Cytology*, 63(5): 459-465.

- **Husmann, K.; Faissner, A.; Schachner, M.**; (1992). Tenascin promotes cerebellar granule cell migration

and neurite outgrowth by different domains in the fibronectin type III repeats. *The Journal of Cell Biology*, 116(6):1475-1486.

- **Ichimura, T.; Ellisman, M.H.**; (1.991). Three-dimensional fine structure of cytoskeletal-membrane interactions at nodes of Ranvier. *The Journal of Neurocytology*, 20(8):667-681.

- **Jacobson, S.**; (1.963). Sequence of myelination in the brain of the albino rat. *Journal of Comparative Neurology*, 121:5-29.

- **Johnson-Green, P.C.; Dow, K.E.; Riopelle, R.J.**; (1.991). Characterization of glycosaminoglycans produced by primary astrocytes in vitro. *Glia*, 4:314-321.

- **Jones, L.S.**; (1.996). Integrins: possible functions in the adult CNS. *Trends in Neuroscience*, 19:68-72.

- **Kahle, W.; Leonhardt, H.; Platzer, W.** Atlas de Anatomía. Sistema nervioso y órganos de los sentidos. Tomo 3. Ediciones Omega, 1.992.

- **Kalb, R.G.; Hockfield, S.**; (1.988). Molecular evidence for early activity-dependent development of hamster motor neurons. *The Journal of Neuroscience*, 8(7):2350-2360.

- **Kalb, R.G.; Hockfield, S.**; (1.990). Large diameter primary afferent input is required for expression of the Cat-301 proteoglycan on the surface of motor neurons. *Neuroscience*, 34(2):391-401.

- **Kobayashi, K.; Emson, P.C.; Mountjoy, C.O.**; (1.989). Vicia villosa lectin-positive neurones in human cerebral cortex. Loss in Alzheimer-type dementia. *Brain Research*, 498(1):170-174.

- **Köpe, G.; Brückner, G.; Brauer, K.; Härtig, W.; Bigl, V.**; (1.997). Developmental patterns of proteoglycan-containing extracellular matrix in perineuronal nets and neuropil of the postnatal rat brain. *Cell Tissue Research*, 288:33-41.

- **Köpe, G.; Brückner, G.; Härtig, W.; Delpech, B.; Bigl, V.**; (1.997). Characterization of proteoglycan-containing perineuronal nets by enzymatic treatments of rat brain sections. *Histochemical Journal*, 29:11-20.

- **Kopper, L.; Bankfalvi, A.; Mihalik, R.; Glant, T.T.; Timar, J.**; (1.990). Proteoglycan-targeted antibodies as markers on non-Hodgkin lymphoma xenografts. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 32(2):137-142.

- **Kosaka, T.; Heizmann, C.W.; Barnstable, C.J.**; (1.989). Monoclonal antibody VC1.1 selectively stains a population of GABAergic neurons containing the calcium-binding protein parvalbumin in the rat cerebral cortex. *Experimental Brain Research*, 78: 43-50.

- **Kosaka, T.; Heizmann, C.W.**; (1.989). Selective staining of a population of parvalbumin-containing

GABAergic neurons in the rat cerebral cortex by lectins with specific affinity for terminal N-acetylgalactosamine. *Brain Research*, 483:158-163.

- Kosaka, T.; Isagai, K.; Barnstable, C.J.; Heizmann, C.W.; (1990). Monoclonal antibody HNK-1 selectively stains a subpopulation of GABAergic neurons containing the calcium-binding protein parvalbumin in the rat cerebral cortex. *Experimental Brain Research*, 82:566-574.

- Kosaka, T.; Heizmann, C.W.; Fujita, S.C.; (1992). Monoclonal antibody 473 selectively stains a population of GABAergic neurons containing the calcium-binding protein parvalbumin in the rat cerebral cortex. *Experimental Brain Research*, 89(1):109-114.

- Kurokawa, T.; Tsuda, M.; Sugino, Y.; (1976). Purification and characterization of a lectin from *Wisteria floribunda* seeds. *Journal of Biological Chemistry*, 251(18):5686-93.

- Lafarga, M.; Berciano, M.T.; Blanco, M.; (1984). The perineuronal net in the fastigial nucleus of the rat cerebellum. A Golgi and quantitative study. *Anatomy and Embriology*, 170:79-85.

- Lander, C.; Kind, P.; Maleski, M.; Hockfield, S.; (1997). A family of activity-dependent neuronal cell-surface chondroitin sulfate proteoglycans in cat visual cortex. *Journal of Neuroscience*, 17:1928-1939.

- Lander, C.; Zhang, H.; Hockfield, S.; (1998). Neurons produce a neuronal cell-surface-associated chondroitin sulfate proteoglycan. *The Journal of Neuroscience*, 18(1):174-183.

- Laywell, E.D.; Dorries, U.; Bartsch, U.; Faissner, A.; Schachner, M.; Steindler, D.A.; (1992). Enhanced expression of the developmentally regulated extracellular matrix molecule tenascin following adult brain injury. *Proceeding of National Academy of Science of USA*, 89(7):2634-2638.

- Le Baron Van Evercooren, A.; Avellana-Adalid, V.; Ben Yunes-Chennoufi, A.; Gansmuller, A.; Nait-Oumesmar, B.; Vignais, L.; (1996). Cell-cell interactions during the migration of myelin-forming cells transplanted in the demyelinated spinal cord. *Glia*, 16(2):147-64.

- Lee, Y.S.; Wurster, R.D.; (1995). Mechanism of potentiation of LY83583-induced growth inhibition by sodium nitroprusside in human brain tumor cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 36(4):341-4.

- Lee, J.Y.; Spicer, A.P.; (2000). Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Current Opinion in Cell Biology*, 12:581-586.

- Lehmenkühler, A.; Syková, E.; Svoboda, J.; Zilles, K.; Nicholson, C.; (1993). Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by

diffusion analysis. *Neuroscience*, 55:339-351.

- **Lugaro, E.**; (1.895). Sulla struttura del nucleo dentado del cervelletto nell'uomo. *Monitore Zool. Ital.*, 6:5-12.

- **Lüth, H.J.; Fischer, J.; Celio, M.R.**; (1.992). Soybean lectin binding neurons in the visual cortex of the rat contain parvanbumin and are covered by glial nets. *Journal of Neurocytology*, 21:211-221.

- **Mabuchi, M.; Murakami, S.; Taguchi, T.; Ohtsuka, A.; Murakami, T.**; (2.001). Purkinje cells in the adult cat cerebellar cortex possess a perineuronal net of proteoglycans. *Archives of Histology and Cytology*, 64(2):203-209.

- **Mac Kay, R.D.; Hockfield, S.J.**; (1.982). Monoclonal antibodies distinguish antigenically discrete neuronal types in the vertebrate central nervous system. *Proceeding National Academy of Sciences of USA*, 79(21):6.747-6.751.

- **Maeda, N.; Hamanaka, H.; Oohira, A.; Noda, M.**; (1.995). Purification, characterization and developmental expression of a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, 6B4 proteoglycan / phosphacan. *Neuroscience*, 67(1):23-35.

- **Margolis, R.U. and Margolis, R.K.**; (1.972). Sulfate turnover in mucopolysaccharides and glycoproteins of brain. *Biochimic and Biophysic Acta*, 264(3):426-431.

- **Margolis, R.U. and Margolis, R.K.**; (1.974). Distribution and metabolism of mucopolysaccharides and glycoproteins in neuronal perikarya, astrocytes, and oligodendroglia. *Biochemistry*, 13(14):2849-2852.

- **Margolis, R.U.; Margolis, R.K.; Chang, L.B.; Preti, C.**; (1.975). Glycosaminoglycans of brain during development. *Biochemistry*, 14(1):85-88.

- **Margolis, R.U.; Margolis, R.K.**; (1.989). Nervous tissue proteoglycans. *Developmental Neuroscience.*, 11:276-288.

- **Margolis, R.K.; Rauch, U.; Maurel, P.; Margolis, R.U.**; (1.996). Neurocan and phosphacan: two major nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycans. *Perspectives Development Neurobiology*, 3(4):273-90.

- **Martínez-Rodríguez, R.; Martínez-Murillo, R.; Toledano, A.; Cubillos, E.**; (1.980). Distribution of peripherally stained neurons by the colloidal iron histochemical method in albino rat crebral cortex. A quantitative study. *Neuroscience Letters*, 17:79-81.

- **Martinotti, C.**; (1.897). Su alcune particolarità delle cellule nervose del midollo spinale messe in evidenza

- colla reazione nera di Golgi. *Giornale R. Accademia di Medicina di Torino* 3(Series IV):103-104.
- **Mestres, P.; Lafarga, M.;** (1.972). Cholinesterase activity in the perineuronal net. *Ann. Histochem.*, 17:135-139.
 - **Meyer, S.;** (1.896). Über eine verbindungsweise der neuronen. *Arch. Mikr. Anat.*, 47:734-748.
 - **Meyer, S.;** (1.897). Ueber die function der protoplasmafortsätze der nervenzelle. *Sitzungsbericht d math-phys. Casse der KS Gesellschaft d Wissenschaften.*
 - **Meyer, S.;** (1.899). Ueber centrale neuritenendigungen. *Arch. Mikrosk. Anat.*, 55:513-558.
 - **Meyer-Puttlitz, B.; Milev, P.; Junker, E.; Zimmer, I.; Margolis, R.U.; Margolis, R.K.;** (1.995). Chondroitin sulfate and chondroitin/keratan sulfate proteoglycans of nervous tissue: Developmental changes of neurocan and phosphacan. *Journal of Neurochemistry*, 65:2.327-2.337.
 - **Meyer-Puttlitz, B.; Junker, E.; Margolis, R.U.; Margolis, R.K.;** (1996). Chondroitin sulfate proteoglycans and the developing central nerous system. II. Immunocytochemical localization of neurocan and phosphacan. *The Journal of Comparative Neurology*, 366(1):44-54.
 - **Mikecz, K.; Glant, T.T.; Poole, A.R.;** (1.987). Immunity to cartilage proteoglycans in BALB/c mice with progressive polyarthritis and ankylosing spondylitis induced by injection of human cartilage proteoglycan. *Arthritis Rheum.* 30(3):306-318.
 - **Milev, P.; Fischer, D.; Häring, M.; Schulthess, T.; Margolis, R.K.; Chiquet-Ehrismann, R.; margolis R.U.;** (1.997). The fibrinogen-like globe of tenascin-C mediates its interactions with neurocan and phosphacan/protein-tyrosina phosphatase- ζ/β . *The Journal of Biological Chemistry*, 272(24):15501-15509.
 - **Milev, P.; Chiba, A.; Häring, M.; Rauvala, H.; Schachner, M.; Ranscht, B.; Margolis, R.K.; Margolis R.U.;** (1.998). High affinity binding and overlapping localization of neurocan and phosphacan/protein-tyrosine phosphatase- ζ/β with tenascin-R, anphoterin, and the heparin-binding growth-associated molecule. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(12):6998-7005.
 - **Müller, T.;** (1.995). Light and electron microscopic demonstration of methylene blue accumulation sites in the murine *Cornu Ammonis* after supravital staining. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*, 100(3):179-187.
 - **Müller, T.;** (1.998). Mehylene blue supravital staining: an evaluation of its applicability to the mammalian brain and pineal gland. *Histology and Histopathology*, 13:1.019-1.026.
 - **Mulligan, K.A.; Van Brederode, J.F.M.; Hendrickson, A.E.;** (1.989). The lectin *Vicia villosa* labels a

distinct subset of GABAergic cells in macaque visual cortex. *Visual Neuroscience*, 2:63-72.

- Murakami, T.; Taguchi, T.; Ohtsuka, A.; Sano, K.; Kaneshige, R.L.; Owen, L.; Jones, A.L.; (1986). A modified method of fine-granular cationic iron colloid preparation: its use in light and electron microscopic detection of anionic sites in the rat kidney glomerulus and certain other tissues. *Archives of Histology of Japan*, 49:13-23.
- Murakami, T.; Tsubouchi, M.; Tsubouchi, Y.; Taguchi, T.; Ohtsuka, A.; (1994). The occurrence of neurons with strongly negatively charged surface coats in mammalian, avian, reptilian, amphibian and piscine brains. *Acta Medica Okayama*, 48(4):195-197.
- Murakami, T.; Ohtsuka, A.; Ono, K.; (1996). Neurons with perineuronal sulfated proteoglycans in the mouse brain and spinal cord: their distribution and reactions to lectin *Vicia villosa* agglutinin and Golgi's silver nitrate. *Archives of Histology and Cytology*, 59:219-231.
- Murakami, T.; Ohtsuka, A.; Piao, D.X.; (1996). Perineuronal sulfated proteoglycans in the human brain are identical to Golgi's reticular coating. *Archives of Histology and Cytology*, 59:233-237.
- Murakami, T.; Murakami, T.; Hong, L.J.; Su, W.D.; Piao, D.X.; Mahmut, N.; Ohtsuka, A.; (1997). Perineuronal sulfated proteoglycans and cell surface glycoproteins in adult and newborn mouse brain, with special reference to their postnatal developments. *Archives of Histology and Cytology*, 60(4):347-354.
- Murakami, T.; Murakami, T.; Hong, L.J.; Su, W.D.; Piao, D.X.; Mahmut, N.; Ohtsuka, A.; (1999). Perineuronal sulfated proteoglycans and cell surface glycoproteins in adult and newborn mouse brain, with special reference to their postnatal developments. *Archives of Histology and Cytology*, 60(4):347-354.
- Murakami, T.; Murakami, T.; Sato, H.; Mubarak, W.A.E.; Ohtsuka, A.; Abe, K.; (1999). Perineuronal nets of proteoglycans in the adult mouse brain, with special reference to their reactions to Gömöri's ammoniacal silver and Ehrlich's methylene blue. *Archives of Histology and Cytology*, 62(1):71-81.
- Murakami, T.; Murakami, T.; Su, W.D.; Ohtsuka, A.; Abe, K.; Ninomiya, Y.; (1999). Perineuronal nets of proteoglycans in the adult mouse brain are digested by collagenase. *Archives of Histology and Cytology*, 62(2):199-204.
- Murakami, T.; Ohtsuka, A.; Su, W.D.; Taguchi, T.; Ohashi, T.; Murakami, T.; Abe, K.; Ninomiya, Y.; (1999). The extracellular matrix in the mouse brain: Its reactions to endo- α -N-acetylgalactosaminidase and certain other enzymes. *Archives of Histology and Cytology*, 62(3):273-281.

- **Murakami, T.; Ohtsuka, A.; Matsuoka, H.; Taguchi, T.; Murakami, T.; Abe, K.; Ninomiya, Y.;** (2001). Intensely positively charged perineuronal nets in the adult rat brain as detected by staining with anionic iron colloid. *Archives of Histology and Cytology*, 64(1):45-50.
- **Murillo-López, F.; Politi, L.; Adler, R.; Hewitt, A.T.;** (1991). Proteoglycansynthesis in cultures of murine retinal neurons and photoreceptors. *cellular and Molecular Neurobiology*, 11(6):579-591.
- **Naegele, J.R.; Arimatsu, Y.; Schwartz, P.; Barnstable, C.J.;** (1988). Selective staining of a subser of GABAergic neurons in cat visual cortex by monoclonal antibody VC1.1. *Journal of Neuroscience*, 8(1): 79-89.
- **Naegele, J.R.; Barnstable, C.J.;** (1991). A carbohydrate epitope defined by monoclonal antibody VC1.1 is found on N-CAM and other cell adhesion molecules. *Brain Research*, 559(1):118-129.
- **Nakagawa, F.; Schulte, B.A.; Wu, J.Y.; Spicer, S.S.;** (1986). GABAergic neurons of rodent brain correspond partially with those staining for glycoconjugate with terminal N-acetylgalactosamine. *Journal of Neurocytology*, 15(3):389-396.
- **Nakagawa, F.; Schulte, B.A.; Spicer, S.S.;** (1986). Selective cytochemical demonstration to glycoconjugate-containing terminal N-acetylgalactosamine on some brain neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, 243(2):280-290.
- **Nakagawa, F.; Schulte, B.A.; Wu, J.Y.; Spicer, S.S.;** (1987). GABAergic neurons of the rodent brain correspond partially with those staining for glycoconjugate with N-acetylgalactosamine on the surface of selected neurons in mouse brain. *Development Neuroscience*, 9: 53-60.
- **Nakagawa, F.; Schulte, B.A.; Wu, J.Y.; Spicer, S.S.;** (1987). Postnatal appearance of glycoconjugate with terminal N-acetylgalactosamine on the surface of selected neurons in mouse brain. *Development Neuroscience*, 9:53-60.
- **Nakagawa, F.; Schulte, B.A.; Wu, J.Y.; Spicer, S.S.;** (1987). Postnatal appearance of glycoconjugate with terminal N-acetylgalactosamine on the surface of selected neurons in mouse brain. *Development Neurosciences*, 9:53-60.
- **Natali, P.G.; Nicotra, M.R.; Bigotti, A.; Botti, C.; Castellani, P.; Risso, A.M.; Zardi, L.;** (1991). Comparative analysis of the expression of the extracellular matrix protein tenascin in normal human fetal, adult and tumor tissues. *International Journal of Cancer*, 47(6):811-61.
- **Nicholls, J.G.; Hernández, U.G.;** (1989). Growth and synapse formation by identified leech neurones in

culture: a review. Q J Exp Physiol, 74(7):965-973.

- **Nicholson, C.; Syková, E.;** (1.998). Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. Trends in Neuroscience, 21(5):207-15.
- **Nissl, F.;** (1.989). Nervenzellen und graue Substanz. Münch Med. Wochenschr, 31-33.
- **Norling, B.; Glimelius, B.; Wasteson, A.;** (1.984). Specificity of inhibition of calcium- and calmodulin-dependent protein kinase by alloxan. Biochimic and Biophysic Acta, 801(2):197-205.
- **Ohtsuka, A.; Taguchi, T.; Sayed, R.; Murakami, T.;** (2.000). The spatial relationship between the perineuronal proteoglycan network and the synaptic boutons as visualized by double staining with cationic colloidal iron method and anti-calbindin-D-28K immunohistochemistry in rat cerebellar nuclei. Archives of Histology and Cytology, 63(4):313-318.
- **Ojima, H.; Ohyama, J.;** (1.998). Molecular heterogeneity of *Vicia villosa*–recognized perineuronal nets surrounditn pyramidal neurons in the guinea pig cerebral cortex. Brain Reseach, 786:274-280.
- **Okamoto, M.; Mori, S.; Endo, H.;** (1.994). A protective action of chondroitin sulfate proteoglycans against neuronal cell death induced by glutamate. Brain Research, 637:57-67.
- **Oohira, A.; Matsui, F.; Watanabe, E.; Kushima, Y.; Maeda, N.;** (1.994). Developmentally regulated expression of a brain specific species of chondroitin sulfate proteoglycan, neurocan, identified with a monoclonal antibody IG2 in the rat cerebrum. Neuroscience, 60(1):145-57.
- **Oohira, A.; Matsui, F.; Yokita, Y.; Yamauchi, S.; Aono, S.;** (2.000). Molecular interactions of neural chondroitin sulfate proteoglycans in the brain development. Archives of Biochemistry and Biophysics, 374(1):24-34.
- **Oohira, A.; Kushima, Y.; Tokita, Y.; Sugiura, N.; Sakurai, K.; Suzuki, S.; Kimata, K.;** (2.000). Effects of lipid-derivatized glycosaminoglycans (GAGs), a novel probe for functional analyses of GAGs, on cell-to-substratum adhesion and neurite elongation in primary cultures of fetal rat hippocampal neurons. Archives of Biochemistry and Biophysics, 378(1):78-83.
- **Palay, S.L.; Chan-Palay, V.;** (1.974). Cerebellar cortex. Cytology and Organization. Springer, Berlin, 311-316.
- **Paul, A.; Ulfing, N.;** (1.998). Lectin staining in the basal nucleus (Meynert) and the hypothalamic tuberomamillary nucleus of the developing human prosencephalon. The Anatomical Record, 252:149-158.

- Paxinos, G. and Watson, C; (1.986). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, Sydney.
- Paxinos, G. and Watson, C: (1.995). The Rat Nervous System. Secon edition. Academic Press, Sydney.
- Perides, G.; Rahemtulla, F.; Lane, W.S.; Asher, R.A.; Bignami, A.; (1.992). Cloning and primary structure of neurocan, a deveopmentally regulated aggregating chondroitin sulphate proteoglycan of brain. Journal of Biological and Chemistry, 267:19536-47.
- Perides, G.; Erickson, H.P.; Rahemtulla, F.; Bignami, A.; (1.993). Colocalization of tenascin with versican, a hyaluronate-binding chondroitin sulfate proteoglycan. Anatomy and Embryology, 188(4):467-479.
- Perlmutter, L.S.; Tweedle, C.D.; Hatton, G.I.; (1.984). Neuronal/glial plasticity in the supraoptic dendritic zone: dendritic bundling and double synapse formation at parturition. Neuroscience, 13(3):769-779.
- Pesold, C.; Liu, W.S.; Guidotti, A.; Costa, E.; Caruncho, H.J.; (1.999). Cortical bitufted, horizontal, and Martinotti cells preferentially express and secrete reelin into perineuronal nets, nonsynaptically modulating gene expression. Proceeding National Academy of Science USA, 96:3217-3222.
- Poole, C.A.; Glant, T.T.; Schofield, J.R.; (1.991). Chondrons from articular cartilage (IV). Immunolocalization of proteoglycan epitopes in isolated anine tibial chondrons. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 39(9):1.175-1.187.
- Presti, D.; Scott, J.E.; (1.994). Hyaluronan-mediated protective effect against cell damage caused by enzymatically produced hydroxyl (OH·) radicals is dependent on hyaluronan molecular mass. Cell Biochemistry Functions, 12:281-288.
- Pubols, B.H.; Pubols, L.M.; DiPette, D.J.; Sheely, J.C.; (1.976). Opossum somatic sensory cortex: a microelectrode mapping study. The Journal of Comparative Neurology, 165(2):229-245.
- Rambourg, A.; Neutra, M.; Leblond, C.P.; (1.966). Presence of a "cell coat" rich in carbohydrate at the surface of cells in the rat. Anatomical Record, 154(1):41-71.
- Ramón y Cajal, S.; (1.890). A propos de certains éléments bipolares du cervelet. Intern Monatschrift Anat u Physiol, 7:13-23.
- Ramón y Cajal, S.; (1.896). El azul de metileno en los centros nerviosos. Revista Trimestral Micrográfica I.
- Ramón y Cajal, S.; (1.897). Las células de cilindro-eje corto. Revista Trimestral Micrográfica II, 105-127.
- Ramón y Cajal, S.; (1.898). La red superficial de las células nerviosas centrales. Revista Trimestral Micrográfica III:199-204.

- **Ramón y Cajal, S.;** (1.911). Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés, vol. 1-2. Azoulay L. (trans). Maloine, Paris, págs 155-158, 550-552.
- **Ramón y Cajal, S.;** (1.972). Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto Ramón y Cajal. Madrid, 550-552.
- **Rauch, U.; Gao, P.; Janetzko, A.; Flaccus, A.; Hilgenberg, L.; Tekotte, H.; Margolis, R.K.; Margolis, R.U.;** (1.991). Isolation and characterization of developmentally regulated chondroitin sulfate and chondroitin/keratan sulfate proteoglycans of brain identified with monoclonal antibodies. The Journal of Biological Chemistry, 266(22):14785-14801.
- **Rauch, U.; Meyer, H.; Brakebusch, C.; Seidenbecher, C.; Gundelfinger, E.D.; Beier, D.R.;** (1997). Sequence and chromosomal localization of the mouse brevican gene. Genomics, 44(1):15-21.
- **Rieger, F.; Daniloff, J.K.; Pincon-Raymond, M.; Crossin, K.L.; Grumet, M.; Edelman, G.M.;** (1.986). Neuronal cell adhesion molecules and cytactin are colocalized at the node of Ranvier. Journal of Cell Biology, 103(2):379-391.
- **Ripellino, J.A.; Bailo, M.; Margolis, R.U.; Margolis, R.K.;** (1.988). Light and electron microscopic studies on the localization of hyaluronic acid in developing rat cerebellum. The Journal of Cell Biology, 106:845-855.
- **Ripellino, J.A.; Margolis, R.U.; Margolis, R.K.;** (1.989). Immunoelectron microscopic localization of hyaluronic acid-binding region and link protein epitopes in brain. The Journal of Cell Biology, 108(5):1899-1907.
- **Rondinini, R.;** (1.931). L'apparato della cellula nervosa in alcuni vertebrati inferiori e sauropsidi. Boll. Soc. It. Biol. Sper. 6:444-447.
- **Rondinini, R.;** (1.931). Ricerche sperimentali sul comportamento dell'apparato periferico nelle cellule nervose di alcuni animali eterotermi (*Lacerta vidirid e muralis*) di fronte alla perfrigerazione. Boll. Soc. It. Biol. Sper., 6:745-747.
- **Rollenhagen, A.; Czaniera, R.; Albert, M.; Wintergerst, E.S.; Schachner, M.;** (2001). Immunocyotological localization of the HNK-1 carbohydrate in murine cerebellum, hippocampus and spinal cord using monoclonal antibodies with different epitope specificities. Journal of Neurocytology, 30(4):337-51.
- **Roßner, S.; Härtig, W.; Schliebs, R.; Brückner, G.; Brauer, K.; Pérez-Polo, J.R.; Wiley, R.G.; Bigl, V.;** (1.995). 192IgG-Saporin immunotoxin-induced loss of cholinergic cells differentially activates microglia in rat

basal forebrain nuclei. *Journal of Neuroscience Research*, 41:335-346.

- **Roughley, P.J.; White, R.J.; Glant, T.T.**; (1987). The structure and abundance of cartilage proteoglycans during early development of the human fetus. *Pediatric Research*, 22(4):409-413.
- **Ruoslahti, E.**; (1996). Brain extracellular matrix. *Glycobiology*, 6(5):489-492.
- **Salm, A.K.; Hatton, G.I.**; (1980). An immunocytochemical study of astrocytes associated with the supraoptic nucleus. *Society for Neuroscience. Absts* 6:547.
- **Salm, A.K.; Smithson, K.G.; Hatton, G.I.**; (1985). Lactation-associated redistribution of the glial fibrillary acidic protein within the supraoptic nucleus. An immunocytochemical study. *Cell and Tissue Research*, 242:9-15.
- **Salm, A.K.; Smithson, G.K.; Hatton, G.I.**; (1985). Lactation -associated redistribution of the glial fibrillary acidic protein within the supraoptic nucleus. *Cell Tissue Research*, 242:9-15.
- **Scott, J.E.; Haigh, M.**; (1988). Keratan sulphate and the ultrastructure of cornea and cartilage: a "standing" for chondroitin sulphate in conditions of oxygen lack? *Journal of Anatomy*, 158:95-108.
- **Schwartig, G.A.; Jungalwala, F.B.; Chou, D.K.H.; Boyer, A.M.; Yamamoto, M.**; (1987). Sulfated glucuronic acid-containing glycoconjugates are temporally and spatially regulated antigens in the developing mammalian nervous system. *Development Biology*, 120:65-67.
- **Schweizer, G.; Ayer-Le Lièvre, Ch.; Le Douarin, N.M.**; (1983). Restrictions of developmental capacities in the dorsal root ganglia during the course of development. *Cell Differentiation*, 13:191-200.
- **Schweizer, M.; Streit, W.; Müller, C.M.**; (1993). Postnatal development and localization of an N-acetylgalactosamine containing glycoconjugate associated with non-pyramidal neurons in cat visual cortex. *Journal Comparative Neurology*, 329:313-327.
- **Seeger, G.; Brauer, K.; Härtig, W.; Brückner, G.**; (1994). Mapping of perineuronal nets in the rat brain stained by colloidal iron hydroxide histochemistry and lectin cytochemistry. *Neuroscience*, 58(2):371-388.
- **Seidenbecher, C.I.; Gundelfinger, E.D.; Bockers, T.M.; Trotter, J.; Kreutz, M.R.**; (1998). Transcripts for secreted and GPI-anchored brevican are differentially distributed in rat brain. *European Journal of Neuroscience*, 10(5):1.621-1.630.
- **Sekirnjak, C.; Martone, M.E.; Weiser, M.; Deerinck, T.; Bueno, E.; Rudy, B.; Ellisman, M.**; (1997). Subcellular localization of the K⁺ channel subunit Kv3.1b in selected rat CNS neurons. *Brain Research*, 766(1-

2):173-187.

- Sharon, N.; Lis, H.; (1.972). Lectins agglutinating and sugar specific proteins. *Science*, 177:949-959.
- Shioi, J.; Refolo, L.M.; Efthimiopoulos, S.; Robakis, N.K.; (1.993). Chondroitin sulfate proteoglycan form of cellular and cell-surface Alzheimer amyloid precursor. *Neuroscience Letters*, 154(1-2):121-124.
- Shioi, J.; Pangalos, M.N.; Rioellino, J.A.; Vassilacopoulou, D.; Mytilineou, C.; Margolis, R.U.; Robakis, N.K.; (1.995). The Alzheimer amyloid precursor proteoglycan (appican) is present in brain and is produced by astrocytes but not by neurons in primary neural cultures. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(20):11839-11844.
- Singleton, P.; Salm, A.K.; (1.996). Differential expression of tenascin by astrocytes associated with the supraoptic nucleus (SON) of hydrated and dehydrated adult rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 373:186-199.
- Snow, A.D.; Kisilevsky, R.; Willmer, J.; Prusiner, S.B.; DeArmond, S.J.; (1989). Sulfated glycosaminoglycans in amyloid plaques of prion diseases. *Acta Neuropathologica (Berl)*, 77(4):337-342.
- Snow, A.D.; Mar, H.; Nochlin, D.; Kresse, H.; Wight, T.N.; (1992). Peripheral distribution of dermatan sulfate proteoglycans (decorin) in amyloid-containing plaques and their presence in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Journal Histochemistry and Cytochemistry*, 40(1):105-113.
- Snow, A.D.; Sekiguchi, R.; Nochlin, D.; Fraser, P.; Kimata, K.; Mizutani, A.; Arai, M.; Schreier, W.A.; Morgan, D.G.; (1.994). An important role of heparan sulfate proteoglycan (Perlecan) in a model system for the deposition and persistence of fibrillar A beta-amyloid in rat brain. *Neuron*, 12(1):219-34.
- Snow, A.D.; Nochlin, D.; Sekiguichi, R.; Carlson, S.S.; (1.996). Identification in immunolocalization of a new class of proteoglycan (keratan sulfate) to the neuritic plaques of Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*, 138:305-317.
- Snyder, S.E.; Li, J.; Schauwecker, P.E.; McNeill, T.H.; Salton, S.R.J.; (1.996). Comparison of RPTP ζ/β , phosphacan, and trkB mRNA expression in the developing and adult rat nervous system and induction of RPTP ζ/β and phosphacan mRNA following brain injury. *Molecular Brain Research*, 40:79-96.
- Solbach, S.; Celio, M.R.; (1.991). Ontogeny of the calcium binding protein parvalbumin in the rat nervous system. *Anatomy and Embryology (Berl)*, 184(2):103-124.
- Sorrell, J.M.; Lintala, A.M.; Mahmoodian, F.; Caterson, B.; (1.988). Epitope-specific changer in

chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycans as markers in the lymphopoietic and granulopoietic compartments of developing bursae of Fabricius. *Journal of Immunology*, 140(12):4263-4270.

- **Steindler, D.A.; Cooper, N.G.**; (1.986). Wheat germ agglutinin binding sites in the adult mouse cerebellum: light and electron microscopic studies. *The Journal of Comparative Neurology*, 249(2):170-185.

- **Stenstad, T.; Magnus, J.H.; Husby, G.**; (1.994). Characterization of proteoglycans associated with mouse splenic AA amyloidosis. *Biochemical Journal*, 303(Pt 2):663-670.

- **Sur, M.; Frost, D.O.; Hockfield, S.**; (1.988). Expression of a surface-associated antigen on Y-cells in the lateral geniculate nucleus is regulated by visual experience. *Journal of Neuroscience*, 8:874-882.

- **Svoboda, J.; Sykova, E.**; (1.991). Extracellular space volume changes in the rat spinal cord produced by nerve stimulation and peripheral injury. *Brain Research*, 570(1-2):216-224.

- **Syková, E.; Chvátal, A.**; (1.993). Extracellular ionic and volume changes: the role in glia-neuron interaction. *The Journal of Chemical Neuroanatomy*, 6(4):247-60.

- **Syková, E.**; (1.997). Extracellular space volume and geometry of the rat brain after ischemia and central injury. *Adv Neurology*, 73:121-135.

- **Szentagothai, J.**; (1.975). The "module-concept" in cerebral cortex architecture. *Brain Research*, 95(2-3):475-496.

- **Taguchi, T.; Kosaka, M.; Murakami, S.; Ohtsuka, A.; Murakami, T.**; (2.000). Intensely negative-charged pericapillary spaces in the rat pineal gland. *Archives of Histology and Cytology*, 63(5):485-94.

- **Theodosis, D.T.; Poulain, D.A.; Vincent, J.D.**; (1.981). Possible morphological bases for synchronisation of neuronal firing in the rat supraoptic nucleus during lactation. *Neurosciences*, 6:919-929.

- **Theodosis, D.T.; Poulain, D.A.**; (1.989). Neuronal-glial and synaptic plasticity in the adult rat paraventricular nucleus. *Brain Research*, 484:361-366.

- **Theodosis, D.T.; Poulain, D.A.**; (1.993). Activity-dependent neuronal-glial and synaptic plasticity in the adult mammalian hypothalamus. *Neuroscience*, 57:501-535.

- **Theodosis, D.T.; McVicar**; (1.996). Neurone-glia interactions in the hypothalamus and pituitary. *Trends in Neuroscience*, 19(8):363-368.

- **Theodosis, D.T.; Pierre, K.; Cadoret, M.A.; Allard, M.; Faissner, A.; Poulain, D.A.**; (1.997). Expression of high levels of the extracellular matrix glycoprotein, tenascin-C, in the normal adult

hypothalamoneurohypophysial system. *The Journal of Comparative Neurology*, 379:386-398.

- **Theodosis, D.T.; Bomhomme, R.; Vitiello, S.; Rougon, G.; Poulain, D.A.;** (1.999). Cell surface expression of polysialic acid on NCAM is a prerequisite for activity-dependent morphological neuronal and glial plasticity. *The Journal of Neuroscience*, 19(23):10228-10236.

- **Thonar, E.J.; Lenz, M.E.; Klintworth, G.K.; Pachman, L.M.; Glickman, P.; Katz, R.; Huff, J.; Kuettner, K.E.;** (1.985). Quantification of keratan sulfate in blood as a marker of cartilage catabolism. *Arthritis Rheum*, 28(12):1367-1376.

- **Tona, A.; Bignami, A.;** (1.993). Effect of hyaluronidase on brain extracellular matrix in vivo and optic nerve regeneration. *Journal of Neurosciences Research*, 36(2):191-199.

- **Trowbridge, I.S.;** (1.974). Isolation and chemical characterization of a mitogenic lectin from *Pisum sativum*. *Journal of Biological Chemistry*, 249(18):6004-12.

- **Tsubouchi, M.; Tsubouchi, Y.; Hitomi, S.; Ohtsuka, A.; Murakami, T.;** (1.996). Perineuronal sulfated proteoglycans, cell surface glycoproteins and dark neurons in the cingulate cortex of newborn and adult rats. *Acta Medica Okayama*, 50(6):313-317.

- **Tsubouchi, Y.; Tsubouchi, M.; Hitomi, S.; Ohtsuka, A.; Murakami, T.;** (1.996). Perineuronal sulfated proteoglycans in the adult rat brain. Histochemical and electron microscopic studies. *Acta Med. Okayama*, 50(5):237-241.

- **Tweedle, C.D.; Hatton, G.I.;** (1.984). Synapse formation and disappearance in adult rat supraoptic nucleus during different hydration states. *Brain Research*, 309:373-376.

- **Van Harreveld, A.;** (1.972). The extracellular space in the vertebrate central nervous system. In: Bourne GH (ed) *Structure and function of nervous tissue*, vol IV. Academic Press, New York, pág. 447-511.

- **Veratti, E.;** (1.900). Su alcune particolarità di struttura dei centri acustici nei mammiferi. *Tipografia Cooperativa*, Pavia, 1-81.

- **Viggiano, D.; Ibrahim, M.; Celio, M.R.;** (2.000). Relationship between glia and the perineuronal nets of extracellular matrix in the rat cerebral cortex: importance for volume transmission in the brain. *Progress in Brain Research*, 125. Chapter 8. p: 193-197.

- **Viggiano, D.;** (2.000). The two faces of perineuronal nets. *Neuroreport*, 11(10):2087-2090.

- **Vitellaro-Zuccarello, L.; De Biasi, S.; Spreafico, R.;** (1.998). One hundred years of Golgi's "perineuronal

net": history of a denied structure. *Italian Journal of Neurological Sciences*, 19(4):249-253.

- **Vitellaro-Zuccarello, L.; Meroni, A.; Amadeo, A.; De Biasi, S.**; (2001). Chondroitin sulfate proteoglycans in the rat thalamus: expression during postnatal development and correlation with calcium-binding proteins in adults. *Cell and Tissue Research*, 306(1):15-26.

- **Von Economo, C.J.**; (1906). Beiträge zur normalen Anatomie der ganglienzelle. *Arch. f Psych. u Nervenkrankh*, 41:158-201.

- **Weber, P.; Bartsch, U.; Rasband, M.N.; Czaniera, R.; Lang, Y.; Bluethmann, H.; Margolis, R.U.; Levison, S.R.; Shrager, P.; Montag, D.; Schachner, M.**; (1999). Mice deficient for tenascin-R display alterations of the extracellular matrix and decreased axonal conduction velocities in the CNS. *The Journal of Neuroscience*, 19(11):4.245-4.262.

- **Weller, A.; Beck, S.; Ekblom, P.**; (1991). Amino acid sequence of mouse tenascin and differential expression of two tenascin isoforms during embryogenesis. *Journal of Cell Biology*, 112(2):355-62.

- **Wintergerst, E.S.; Faissner, A.; Celio, M.R.**; (1996). The proteoglycan DSD-1-PG occurs in perineuronal nets around parvalbumin-immunoreactive interneurons of the rat cerebral cortex. *International Journal Developmental Neuroscience*, 14(3): 249-255.

- **Xiao, Z.C.; Barstch, U.; Margolis, R.K.; Margolis, R.U.; Rougon, G.; Montag, D.; Schachner, M.**; (1997). Isolation of a tenascin-R receptor from mouse brain membranes: a phosphacan-related chondroitin sulfate glycoproteoglycan. *Journal of Biological Chemistry*, 272:32092-32101.

- **Yamada, H.; Watanabe, K.; Shimonaka, M.; Yamaguchi, Y.**; (1994). Molecular cloning of brevican, a novel brain proteoglycan of the aggrecan/versican family. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(13):10.119-10.126.

- **Yamada, H.; Fredette, B.; Shitara, K.; Hagihara, K.; Miura, R.; Ranscht, B.; Stallcup, W.B.; Yamaguchi, Y.**; (1997). The brain chondroitin sulfate proteoglycan brevican associates with astrocytes ensheathing cerebellar glomeruli and inhibits neurite outgrowth from granule neurons. *The Journal of Neuroscience*, 17(20):7.784-7.795.

- **Yamaguchi, Y.**; (1996). Brevican: a major proteoglycan in adult brain. *Perspectives in Developmental Neurobiology*, 3(4):307-317.

- **Yamaguchi, Y.**; (2000). Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *CMLS Cellular and*

Molecular Life Sciences, 57:276-289.

- **Yasuhara, O.; Akiyama, H.; McGeer, E.G.; McGeer, P.L.;** (1.994). Immunohistochemical localization of hyaluronic acid in rat and human brain. *Brain Research*, 635:269-282.
- **Yoshida, K.; Gage, F.H.;** (1.991). Fibroblast growth factors stimulate nerve growth factor synthesis and secretion by astrocytes. *Brain Research*, 538:118-126.
- **Zaremba, S.; Guimarães, A.; Kalb, R.G.; Hockfield, S.;** (1.989). Characterization of an activity-dependent, neuronal surface proteoglycan identified with monoclonal antibody Cat-301. *Neuron*, 2:1.207-1.219.
- **Zaremba, S.; Naegelé, J.R.; Barnstable, C.J.; Hockfield, S.;** (1.990). Neuronal subsets express multiple high-molecular-weight cell-surface glycoconjugates defined by monoclonal antibodies Cat-301 and VC1.1. *The Journal of Neuroscience*, 10(9):2985-2995.
- **Zaremba, S.; Kelly, G.; Kalb, R.; Hockfield, S.;** (1.990). Keratan sulfate proteoglycans associated with neuronal surfaces in CNS. *Society for Neuroscience Abstracts*, 16:469.
- **Zhang, Y.; Campbell, P.N.; Martini, R.; Schachner, M.; Lieberman, A.R.;** (1.995). Molecular basis of interactions between regenerating adult rat thalamic axons and Schwann cells in peripheral nerve grafts II. Tenascin-C. *The Journal of Comparative Neurology*, 361:210-224.
- **Zhou, X-H.; Brakebusch, C.; Matthies, H.; Ohashi, T.; Hirsch, E.; Moser, M.; Krug, M.; Seidenbecher, C.I.; Boeckers, T.M.; Rauch, U.; Buettner, R.; Gundelfinger, E.D.; Fässler, R.;** (2.001). Neurocan is dispensable for brain development. *Molecular and Cellular Biology*, 21(17):5970-5978.

